

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**PERFILES GÉNICOS CON VALOR
PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA
LOCALIZADO: COMPARACIÓN Y
VALIDACIÓN MEDIANTE qRT-PCR A
PARTIR DE MUESTRAS PARAFINADAS**

Memoria presentada para la obtención del grado de

Doctor en Medicina por

Álvaro Pinto Marín

Dirigida por el Prof. Manuel González Barón,

el Dr. Enrique Espinosa Arranz y el Dr. Juan Ángel Fresno Vara

Madrid, 2009

D. Manuel González Barón, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y Director de la Cátedra de Oncología Médica y Medicina Paliativa de la Universidad Autónoma de Madrid,

D. Enrique Espinosa Arranz, Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y Clínico Colaborador Docente de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y

D. Juan Ángel Fresno Vara, miembro de la unidad de Oncología Traslacional del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz

Certifican:

Que D. Álvaro Pinto Marín ha realizado durante los últimos tres años, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “Perfiles génicos con valor pronóstico en cáncer de mama localizado: comparación y validación mediante qRT-PCR a partir de muestras parafinadas”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Estimamos que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación.

Madrid, 3 de marzo de 2009

Prof. Dr. Manuel González Barón

Dr. Enrique Espinosa Arranz

Dr. Juan Ángel Fresno Vara

A Laura

A mis padres y a mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo ha resultado inestimable la colaboración de un excelente equipo de profesionales compuesto por oncólogos, patólogos, biólogos moleculares y estadísticos. Sin su ayuda y su esfuerzo, esta investigación no habría podido salir adelante.

En primer lugar, quisiera agradecer al Prof. Manuel González Barón su apoyo y su constante estímulo a la hora de llevar a cabo este trabajo. Su experiencia y sus consejos han sido de enorme utilidad para llevar a cabo esta tesis, al igual que muchas otras.

Al Dr. Enrique Espinosa, compañero del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz, por su habilidad a la hora de dirigirme en la realización de este trabajo, y por todo lo que he aprendido a su lado.

Al Dr. Juan Ángel Fresno, por su energía y su apoyo en todo lo concerniente al campo de la biología molecular, base indispensable para que este trabajo haya llegado a buen puerto.

A Iker Sánchez y Ángelo Gámez, por las incontables horas de arduo trabajo en el laboratorio y por su impagable colaboración en el desarrollo de este estudio, y en general a todo el personal del Laboratorio de Oncología Traslacional de nuestro servicio.

A la Prof. Rosario Madero, por su insustituible ayuda en los análisis estadísticos, que han resultado de especial importancia y dificultad en este trabajo.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, en especial al Dr. David Hardisson, por su colaboración en la realización del análisis de las muestras tumorales conservadas en parafina.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz: médicos adjuntos, residentes, enfermeras, auxiliares y secretarías. Sin vuestra ayuda a lo largo de todos estos años, nada habría sido igual. Mi agradecimiento especial al Dr. Andrés Redondo por su gran apoyo a la hora de realizar esta tesis.

Al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Salud y Consumo (expediente 050668), por la beca de investigación que ha hecho posible este trabajo.

Y, por último, mi mayor agradecimiento a mi familia, que me ha acompañado y cuidado sin descanso durante la realización de esta tesis. En especial a Laura, que siempre ha estado a mi lado durante los momentos más difíciles, y también a mis padres Melquiades e Isabel y a mi hermano Jorge, porque gracias a su ánimo incondicional todo esto ha sido posible.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Epidemiología y patogénesis del cáncer de mama	2
2. Historia natural del cáncer de mama	4
2.1. Variedad histológica	4
2.2. Definición de los estadios	5
2.3. Diseminación de la enfermedad	9
3. Tratamiento del cáncer de mama localizado	11
3.1. Principales factores pronósticos y predictivos de respuesta	12
3.2. Elección del tratamiento adyuvante	21
3.3. Hormonoterapia y quimioterapia adyuvante: opciones posibles, beneficio y toxicidad	26
4. Otros factores pronósticos en cáncer de mama	32
5. Papel de las técnicas de análisis de múltiples genes	38
5.1. Descripción de las técnicas de análisis de biología molecular	39
5.2. Aplicaciones de los análisis de múltiples genes en el cáncer de mama	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
1. Hipótesis	56
2. Objetivos	57
MATERIAL Y MÉTODOS	58
1. Características clínico-patológicas de las enfermas	59
2. Perfiles de expresión génica con valor pronóstico	60
3. Procesamiento de las muestras	64
4. Análisis estadístico	67
RESULTADOS	69
1. Características clínico-patológicas	70

2. Análisis de la expresión génica en la población global	72
3. Análisis en el subgrupo con afectación ganglionar	77
DISCUSIÓN	79
1. Discusión de los métodos	81
1.1. Perfiles de genes analizados	81
1.2. Procesamiento y análisis de los perfiles génicos	83
1.3. Técnica de qRT-PCR	84
2. Discusión de los resultados	86
2.1. Características clínico-patológicas de las pacientes: comparación con la población analizada en los tres perfiles génicos	86
2.2. Capacidad predictiva de cada uno de los perfiles génicos	88
3. El futuro de los perfiles génicos en la práctica clínica	90
CONCLUSIONES	94
RESUMEN	96
BIBLIOGRAFÍA	99
CLAVES DE LAS ABREVIATURAS	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de estadificación del carcinoma de mama (American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2002)	6
Tabla 2. Agrupación por estadios según la clasificación TNM	7
Tabla 3. Supervivencia según la localización de las metástasis	11
Tabla 4. Porcentajes de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a largo plazo en función del tamaño y de la afectación ganglionar	14
Tabla 5. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en tumores localizados, según el número de ganglios	15
Tabla 6. Índice pronóstico de Nottingham: resultados de un estudio de validación sobre 402 pacientes seguidas durante una media de 15 años	23
Tabla 7. Definición del riesgo de recaída de pacientes con cáncer de mama según el consenso de St. Gallen de 2007	24
Tabla 8. Tratamiento adyuvante sistémico en pacientes con cáncer de mama operable según consenso de St. Gallen de 2007	25
Tabla 9. Esquemas de quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama	30
Tabla 10. Criterios de inclusión	59
Tabla 11. Genes analizados extraídos del perfil publicado por van't Veer y cols	61
Tabla 12. Genes analizados extraídos del perfil publicado por Paik y cols	63
Tabla 13. Genes analizados extraídos del perfil publicado por Ma y cols	64
Tabla 14. Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas	71
Tabla 15. Variables con valor pronóstico estadísticamente significativo en el análisis univariante	74
Tabla 16. Resultados del análisis multivariante	75
Tabla 17. Concordancia entre los tres perfiles analizados (V de Cramer)	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 (1a y 1b). Estimación de la supervivencia libre de enfermedad a 10 años y beneficio del tratamiento adyuvante en 2 pacientes con diferente pronóstico, mediante el empleo del programa Adjuvant TM	27
Figura 2. Esquema del proceso experimental del análisis de la expresión génica con <i>microarrays</i>	41
Figura 3. Emisión de fluorescencia en la reacción de qRT-PCR	44
Figura 4. Curvas patrón de qRT-PCR. Se representa la relación inversa entre la cantidad de ADN de la muestra y el ciclo umbral (Ct)	45
Figura 5. Tarjeta microfluídica (<i>Taqman Low Density Array</i>)	46
Figura 6. Análisis de SLM a 5 años para cada uno de los perfiles	73
Figura 7. Análisis de la SLM a 5 años en los casos con afectación ganglionar	78

Introducción

1. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres occidentales, y el tercero en frecuencia en todo el mundo (1). Así mismo, supone la quinta causa de muerte por cáncer en toda la población y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Más de la mitad de los casos se producen en países desarrollados. En el último informe publicado, se estima que 1 de cada 8 mujeres en Estados Unidos serán diagnosticadas de cáncer de mama a lo largo de su vida (2). En España, actualmente se diagnostican unos 16.000 casos nuevos al año, lo que representa una incidencia de 67 casos por 100.000 habitantes (3), y cerca de 6.000 mujeres fallecen anualmente a consecuencia de este tumor. Sin embargo, desde la década de los 90 se ha observado un progresivo descenso de la mortalidad por cáncer de mama, gracias a los programas de diagnóstico precoz y a la mayor eficacia de los tratamientos administrados. Así, la supervivencia global se sitúa actualmente por encima del 70% a los 5 años del diagnóstico (3).

En la génesis del cáncer de mama existe en muchos casos una influencia hormonal. Algunos de los factores de riesgo conocidos (menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad, terapia hormonal postmenopáusica, etc.) ocasionan una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes (4). Otros factores estudiados, como el alcohol, el tabaco, el sedentarismo o los anticonceptivos orales, podrían justificar la mayor incidencia de esta neoplasia en mujeres de clase socioeconómica alta (5). Por otro lado, los antecedentes familiares de cáncer de mama suponen un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad, que se incrementa hasta un 60-80% en aquellas mujeres portadoras de una mutación en alguno de los principales genes de susceptibilidad (BRCA-1 y BRCA-2) (4).

Las neoplasias mamarias se originan en el epitelio glandular, donde las células epiteliales normales se transforman primero en una hiperplasia ductal atípica, y posteriormente en un carcinoma intraductal o *in situ*. Con el tiempo, el tumor traspasa la membrana basal e invade el estroma circundante, transformándose en un carcinoma infiltrante o invasivo (6). Se han realizado varios estudios que comparan los perfiles de expresión génica de estos estadios histológicos. En ellos se observa que el perfil génico del carcinoma infiltrante es muy similar al del carcinoma *in situ*, e incluso al de la hiperplasia ductal atípica, pero, sin embargo, es muy diferente al perfil de la célula epitelial normal, lo que sugiere que la principal alteración en la expresión génica ocurriría en el proceso de transformación de la célula epitelial normal en la célula de la hiperplasia ductal atípica (7-9).

El cáncer de mama es una enfermedad genética muy heterogénea. Las alteraciones genéticas que se producen en la carcinogénesis afectarán fundamentalmente a las células epiteliales malignas, aunque también se han observado en otras células que interaccionan con el tumor, como las células del estroma, las células del sistema inmune o las células vasculares (10). La mayoría de estas alteraciones son adquiridas, aunque en ocasiones pueden ocurrir en genes que se transmiten a la descendencia. Algunos de estos genes, como el BRCA-1 y el BRCA-2, son los responsables de los síndromes hereditarios mejor caracterizados. Menos frecuentemente, las alteraciones heredadas son mutaciones o polimorfismos que aumentan el riesgo de cáncer pero con una baja penetrancia (11,12).

El desarrollo del cáncer de mama puede favorecerse por la activación de determinados genes, denominados oncogenes, o por la pérdida de función de otros, conocidos como genes supresores de tumores. Estas alteraciones génicas otorgarán a las células

neoplásicas las diversas características de malignidad: inmortalidad, proliferación descontrolada, invasión, migración, angiogénesis y resistencia a fármacos (12).

Hasta los años 80 los estudios de biología molecular del cáncer de mama se limitaban a los receptores de estrógenos y de progesterona. En esa década se inició la investigación sobre otros factores de crecimiento, así como sobre algunos oncogenes y genes supresores de tumores. En los años 90 se realizaron avances sobre genes relacionados con el ciclo celular, la apoptosis y genes de reparación del ADN, y se descubrieron los genes causantes de algunos síndromes familiares. Finalmente, en los últimos años las técnicas de análisis de múltiples genes han posibilitado ampliar los conocimientos moleculares de esta enfermedad.

2. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA.

2.1. Variedad histológica

La mayoría de los carcinomas de mama son tumores infiltrantes, aunque habitualmente tienen asociado un componente de carcinoma *in situ*. Con menor frecuencia se diagnostica exclusivamente un carcinoma *in situ*, enfermedad que tiene un pronóstico mucho más favorable que el carcinoma infiltrante (13).

Casi el 80% de las neoplasias de mama infiltrantes pertenecen a la variedad ductal. El segundo tipo histológico más frecuente es el carcinoma lobulillar infiltrante, que supone entre el 5 y el 15% (14). Aunque ambos tipos histológicos comparten diversas características clínicas, el carcinoma lobulillar expresa con mayor frecuencia receptores hormonales (RH), y presenta un patrón de diseminación diferenciado, con una afectación más frecuente a nivel gastrointestinal, ovárico, peritoneal y suprarrenal (15).

Aun hoy día continúa existiendo una controversia sobre la influencia de la histología en el pronóstico de la enfermedad. En algunas series se ha observado que la supervivencia

global (SG) del carcinoma lobulillar es ligeramente mejor que la del carcinoma ductal, aunque la tasa de recaídas parece similar (16,17). Sin embargo, hay otros estudios que no han encontrado diferencias en el pronóstico de estos tumores (15,18).

Existen otros subtipos de carcinoma de mama menos frecuentes, como el medular, el coloide, el tubular, el comedocarcinoma y el papilar, los cuales suponen, en conjunto, menos del 10% de todos los tumores invasivos. Estos tumores presentan un mejor pronóstico, con una tasa de supervivientes a largo plazo situada un 10-20% por encima de la asociada a las formas histológicas habituales (ductal y lobulillar) (16,19).

2.2. Definición de los estadios

El curso clínico del cáncer de mama se caracteriza por una historia natural prolongada y por una evolución clínica altamente heterogénea. En la mayor parte de los casos, en el momento del diagnóstico la enfermedad se encuentra limitada a la mama, con o sin afectación ganglionar, pero en el 5% de los casos existe una diseminación metastásica desde el inicio (13).

La clasificación del cáncer de mama mediante el sistema TNM divide la enfermedad en varios estadios en función del tamaño del tumor primario (T) y del estado ganglionar (N). En el cáncer de mama se ha definido una estadificación clínica, que se realiza mediante la exploración física y radiológica de la mama y las cadenas ganglionares, y una estadificación anatomopatológica, que se realiza tras la intervención quirúrgica. Las categorías T son equivalentes en ambas clasificaciones, pero las categorías N varían de una a otra (20). Actualmente se emplea la clasificación inicialmente publicada por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) en 1997 y posteriormente revisada en 2002 (21), la cual se refleja en la Tabla 1. La clasificación por estadios se recoge en la Tabla 2.

Tabla 1. Sistema de estadificación del carcinoma de mama (American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2002) (21).

<p>Tumor primario (T)</p> <p><i>Las categorías de la clasificación clínica y anatomopatológica son iguales</i></p> <p>T1: hasta 2 cm</p> <p> T1mic: $\leq 0,1$ cm</p> <p> T1a: $>0,1$ a $0,5$ cm</p> <p> T1b: $>0,5$ a 1 cm</p> <p> T1c: >1 a 2 cm</p> <p>T2: > 2 a 5 cm</p> <p>T3: >5 cm</p> <p>T4: extensión a pared torácica o piel</p> <p> T4a: extensión a pared torácica</p> <p> T4b: edema (incluyendo “piel de naranja”) o ulceración de la piel, o nódulos satélites en la piel de la misma mama</p> <p> T4c: ambos (T4a + T4b)</p> <p> T4d: carcinoma inflamatorio</p> <p>Ganglios linfáticos regionales (N)</p> <p>- <i>Clasificación clínica:</i></p> <p>N0: no hay evidencia de metástasis ganglionares regionales</p> <p>N1: metástasis móviles en ganglios axilares ipsilaterales</p> <p>N2: metástasis en ganglios axilares fijos, o en ganglios mamaros internos en ausencia de evidencia de metástasis en ganglios axilares</p> <p>N3: metástasis en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamaros internos en presencia de metástasis en ganglios axilares, o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales</p> <p>- <i>Clasificación anatomopatológica:</i></p> <p>pN0: ausencia de metástasis ganglionares</p> <p>pN1mi: micrometástasis (< 2 mm)</p> <p>pN1: metástasis en 1-3 ganglios axilares, y/o ganglios mamaros internos con metástasis microscópicas</p> <p>pN2: metástasis en 4-9 ganglios axilares, o en ganglios mamaros internos clínicamente aparentes en ausencia de metástasis axilares</p> <p>pN3: metástasis en 10 o más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamaros internos en presencia de metástasis axilares, o en ganglios supraclaviculares</p> <p>Metástasis a distancia</p> <p>M0: no hay evidencia de metástasis a distancia</p> <p>M1: metástasis a distancia</p>

Tabla 2. Agrupación por estadios según la clasificación TNM (20).

Estadio I	T1N0M0
Estadio IIA	T0N1M0
	T1N1M0
	T2N0M0
Estadio IIB	T2N1M0
	T3N0M0
Estadio IIIA	T0N2M0
	T1N2M0
	T2N2M0
	T3N1-2M0
Estadio IIIB	T4N0-2M0
Estadio IIIC	T0-4N3M0
Estadio IV	T0-4N0-3M1

Cuando se habla del pronóstico para los estadios I a III, el parámetro más empleado es la supervivencia libre de enfermedad (SLE), ya que depende de cuántas pacientes recaerán y cuánto tiempo transcurrirá hasta que esto suceda. En el estadio I, la SLE varía entre el 77% y el 92%, dependiendo de las series que se consulten (19,22-24). El estadio II es más heterogéneo, ya que incluye pacientes con y sin ganglios axilares afectados, de modo que la SLE oscila entre el 50% y el 81% (19,22-24). En el estadio III, la SLE tiene un margen aún mayor, según los distintos estudios, situándose entre el 35% y el 70% (23,25).

El estadio IV corresponde a la enfermedad diseminada o metastásica. Dado que la enfermedad diseminada es una situación por lo general incurable, el parámetro más importante en cuanto al pronóstico es la supervivencia global (SG). La supervivencia libre de progresión resulta interesante para evaluar la eficacia de los tratamientos administrados.

De cualquier modo, hoy en día la clasificación más práctica del cáncer de mama, desde el punto de vista pronóstico y terapéutico, divide a la enfermedad en tres etapas: enfermedad localizada, enfermedad localmente avanzada y enfermedad diseminada (26). La división entre enfermedad localizada y localmente avanzada se realiza habitualmente mediante la exploración física. La enfermedad diseminada se diagnostica con pruebas de imagen.

La enfermedad localizada es la presentación más frecuente, diagnosticándose, aproximadamente, en el 80% de las mujeres con cáncer de mama invasivo. Incluye a los tumores menores de 5 cm sin ganglios axilares palpables, o con ganglios axilares móviles (es decir, a los estadios I y a la mayoría de los estadios II) (14). El tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica inicial, seguida habitualmente de un tratamiento adyuvante o complementario sistémico y, en los casos indicados, radioterapia.

La enfermedad localmente avanzada se diagnostica en el 10-15% de las enfermas. Se corresponde con todos los estadios III según la clasificación clínica y algunos estadios II, de manera que engloba diferentes presentaciones clínicas: tumor primario mayor de 5 cm, o con extensión a piel o pared torácica, afectación ganglionar axilar fija o de gran tamaño, o bien afectación ganglionar supraclavicular o de la cadena mamaria interna (14). Estos casos se tratan inicialmente con quimioterapia (u, ocasionalmente, hormonoterapia), seguida del tratamiento quirúrgico una vez obtenida la máxima respuesta, y posteriormente valoración de nuevo tratamiento sistémico y radioterapia.

Por último, la enfermedad diseminada o estadio IV, como se ha comentado previamente, se observa tan solo en el 5% de las enfermas en el momento del diagnóstico inicial (13). En estos casos se realizan con frecuencia tratamientos específicos con intención paliativa, que suelen consistir en quimioterapia u hormonoterapia, aunque en ocasiones también se pueden plantear tratamientos locales (radioterapia, cirugía, etc).

2.3. Diseminación de la enfermedad

Cuando el tumor no se trata adecuadamente o cuando existe una resistencia al tratamiento realizado, la proliferación de las células neoplásicas ocasionará la invasión de estructuras adyacentes (planos musculares, parrilla costal, piel, etc). Asimismo, se producirá una invasión de conductos linfáticos y se afectarán los ganglios linfáticos situados en las estaciones de drenaje de la mama (axila, hueco supraclavicular y cadena mamaria interna). Las células tumorales también podrán invadir los vasos sanguíneos de la microcirculación de la glándula mamaria, y algunas de ellas se desplazarán por el torrente circulatorio para dar lugar a las metástasis, con una localización preferente en hueso, hígado y pulmón. Con menor frecuencia puede observarse afectación metastásica en piel, tejido subcutáneo, cerebro, coroides, meninges, glándulas suprarrenales y tubo digestivo (14).

La heterogeneidad molecular del cáncer de mama tiene una correlación clínica, de forma que la evolución de la enfermedad podrá ser muy diferente en pacientes que en principio se diagnostiquen en un mismo estadio. En aquellas que se produzca una recidiva, ésta puede ocurrir desde pocos meses tras del diagnóstico (recaída temprana) hasta muchos años después (recaída tardía) (26).

La recaída puede ser local, si tiene lugar en la piel o en la pared torácica adyacente a la cicatriz quirúrgica, loco-regional, si afecta además a los ganglios de drenaje de la mama,

o a distancia, si aparece en otros órganos. Cuando la recaída se produce exclusivamente a nivel local es potencialmente curable, aunque se incrementa considerablemente el riesgo de metástasis a distancia (27,28).

Desde el punto de vista clínico existen dos tipos de recaídas: de bajo riesgo y de alto riesgo. Las pacientes con una recaída de bajo riesgo tienen tumores con RH positivos y presentan metástasis de localización cutánea, subcutánea, ganglionar u ósea (aunque también se incluyen las metástasis pleuro-pulmonares cuando la afectación no es masiva). En estos casos, el intervalo libre de recurrencia desde el tratamiento primario suele ser superior a un año (29). La enfermedad suele evolucionar lentamente, es habitual que responda a un tratamiento hormonal, y es compatible con una supervivencia prolongada. Las enfermas con una recaída de alto riesgo son aquéllas que tienen una afectación cerebral o meníngea, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares múltiples, linfangitis carcinomatosa pulmonar o derrame pleural masivo, así como las que recaen poco tiempo después del tratamiento adyuvante, presentan RH negativos o no responden a los tratamientos hormonales. La evolución de este tipo de recaídas suele ser más rápida y pone en peligro la vida de las enfermas en un corto plazo de tiempo (13,26).

Antes de 1970, la expectativa de vida de una mujer con cáncer de mama metastásico era inferior a un año (30). En las décadas posteriores se ha producido una mejoría progresiva de la supervivencia, de manera que actualmente se considera que una paciente con un cáncer de mama diseminado tiene una expectativa vital de 2 a 3 años como término medio, si bien los límites son muy amplios, en función de la localización de la recaída y de la sensibilidad del tumor a los tratamientos administrados. De todos modos, y a pesar de que se haya comunicado la existencia de un pequeño porcentaje de

supervivientes a largo plazo (31), la enfermedad diseminada sigue siendo una situación hoy en día incurable.

La Tabla 3 refleja la SG asociada a metástasis en distintos órganos. Estas cifras son sólo orientativas, puesto que dependen mucho de los tratamientos realizados y de la respuesta a los mismos. Por ejemplo, la mediana de SG en pacientes con metástasis cerebrales es de 3 a 6 meses, pero se han comunicado cifras de hasta 16 meses cuando la metástasis es única y se puede extirpar (32).

Tabla 3. Supervivencia según la localización de las metástasis.

	Harris y cols. (33)	Insa y cols. (34)
Partes blandas	--	36 meses
Hueso	--	28 meses
Cerebro	3-6 meses	4 meses
Meninges	3-6 meses	--
Hígado	3-6 meses	12 meses
Pulmón	--	14 meses
Derrame pleural	1-2 años	--
Derrame pericárdico	20 meses	--

3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA LOCALIZADO

El tratamiento del cáncer de mama en estadios precoces suele iniciarse con la extirpación quirúrgica. La técnica quirúrgica puede consistir en una mastectomía, o bien llevarse a cabo una cirugía más conservadora (tumorectomía o cuadrantectomía). Para reducir el riesgo de recaída local se aconseja administrar radioterapia sobre la mama siempre que se lleve a cabo una cirugía conservadora, para que la eficacia del procedimiento sea similar a la realización de una mastectomía (13).

Tras la cirugía, hoy en día, la práctica totalidad de las enfermas reciben un tratamiento sistémico adyuvante, ya sea con quimioterapia, con hormonoterapia, o con las dos opciones, cuya elección dependerá de los factores pronósticos y predictivos de respuesta que estén presentes.

Es preciso aclarar la diferencia conceptual entre los factores pronósticos y los factores predictivos de respuesta. Los primeros aportan información en el momento del diagnóstico sobre los resultados clínicos esperados, en cuanto a la probabilidad de recidiva y supervivencia, independientemente del tratamiento administrado. Los factores predictivos otorgan información sobre la probabilidad de respuesta a un tipo concreto de tratamiento. En ocasiones, un factor puede ser a la vez pronóstico y predictivo de respuesta, como los RH y el Her-2/neu.

3.1. Principales factores pronósticos y predictivos de respuesta

El pronóstico y la evolución clínica del cáncer de mama presentan una gran variabilidad de unas enfermas a otras. Desde hace años se conocen diversos factores pronósticos que ayudan a distinguir grupos de enfermas con una probabilidad de recidiva muy diferente. Los dos factores que más influyen en el pronóstico del cáncer de mama son el estado ganglionar y el tamaño del tumor primario (35-37). La supervivencia de las mujeres con tumores grandes y con ganglios afectados es claramente inferior a la de aquellas que tienen tumores pequeños y ganglios negativos. Esta situación justifica la necesidad de un tratamiento complementario o adyuvante que intente aumentar la tasa de curaciones de las enfermas con tumores de peor pronóstico.

En la elección del tratamiento adyuvante más adecuado para cada paciente, además del estado ganglionar y del tamaño, son importantes otros factores pronósticos o predictivos de respuesta, como el grado de diferenciación, la edad, los RH y el Her2/neu. A continuación se analizarán todos estos factores con detalle.

a) Tamaño del tumor primario

El tamaño del tumor primario es, probablemente, el segundo factor pronóstico en importancia tras los ganglios axilares. La relación entre tamaño y pronóstico es prácticamente lineal.

Las pacientes con tumores menores de 1 cm y sin ganglios tienen un pronóstico excelente, como se observa en una serie de más de 1.200 enfermas seguidas durante una media de 8 años, en la que tanto la SG como la SLE superaron el 90% (25). En otra serie importante, sin embargo, las enfermas en esta misma situación sólo tuvieron una SLE del 80% (19). Si el tamaño se sitúa entre 1 y 2 cm, la SLE y la SG descienden hasta situarse entre el 70% y el 85% (19,38,39). Existen diferencias entre los estudios más antiguos, en los que las cifras de supervivencia suelen ser más desfavorables, en parte porque parte de las enfermas recibieron un tratamiento subóptimo, y los estudios más modernos, en los que la mejor supervivencia puede deberse al menos en parte a la aplicación de tratamientos más idóneos.

Los tumores T2N0, es decir, entre 2 y 5 cm, se asocian a una SLE a largo plazo de aproximadamente un 70%, mientras que si el tamaño supera los 5 cm, el porcentaje se sitúa en torno al 60% (40).

Por tanto, en pacientes sin ganglios afectos, la SLE a largo plazo sería alrededor del 90% con tumores de menos de 1 cm, 80% entre 1 y 2 cm, 70% entre 2 y 5 cm, y 60% a partir de 5 cm. Cuando existe afectación ganglionar, este parámetro predomina sobre el tamaño a la hora de determinar el pronóstico y las cifras de SLE descienden significativamente, como se puede observar en la Tabla 4 (22-24,26). La SG ha sido descrita en un número menor de estudios, pero hay que destacar un gran análisis realizado en casi 25.000 mujeres seguidas a largo plazo en EEUU, en el cual, además de la evaluación de la SG, resulta de interés la relación directa que se encontró entre el

tamaño del tumor y la presencia de ganglios axilares. A partir de los 5 cm, el 71% de las pacientes tenían la axila infiltrada. El número de ganglios también guardaba esta relación: si el tamaño del tumor no superaba los 3 cm, el número de ganglios solía estar entre 1 y 3, pero a partir de dicho tamaño era más probable la afectación de 4 ó más ganglios (41).

Tabla 4. Porcentajes de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a largo plazo en función del tamaño y de la afectación ganglionar (22-24,41).

	SLE	SG
	Ganglios negativos	
Hasta 2 cm	80-90 %	91 %
>2 cm hasta 5 cm	70 %	89 %
> 5 cm	60 %	82 %
	Ganglios positivos	
Hasta 2 cm	63-50 %	87 si 1-3 gg., 66 si ≥ 4 gg
>2 cm. hasta 5 cm	50-35 %	80 si 1-3 gg., 58 si ≥ 4 gg
> 5 cm	35-21 %	73 si 1-3 gg., 45 si ≥ 4 gg

SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global, gg.: ganglios

b) Estado ganglionar

El estado de los ganglios axilares al diagnóstico es, sin duda, el principal factor pronóstico del cáncer de mama. En líneas generales, la supervivencia a largo plazo de las pacientes con afectación ganglionar es aproximadamente del 50%, aunque variará según el número de ganglios infiltrados. A pesar de la influencia del número de ganglios en el pronóstico del cáncer de mama, no ha pasado a formar parte de la estadificación hasta la edición del año 2002 de la clasificación TNM (21).

Ya se ha comentado un estudio en el que la SG variaba no sólo según el tamaño del tumor primario sino según el número de ganglios axilares (1-3 o más de 3) (41). Los datos del mismo aparecen incorporados a la Tabla 5. El grupo cooperativo *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) ha publicado los datos del seguimiento a largo plazo de una serie de 905 pacientes que recibieron quimioterapia con esquemas sin antraciclinas (37). Todas las pacientes tenían ganglios afectados, pero el número de éstos influyó significativamente tanto en la SLE como en la SG. La SLE disminuyó desde un 55% cuando había hasta 3 ganglios afectados hasta un 15% cuando había 10 o más, como puede observarse en la Tabla 5.

Tabla 5. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en tumores localizados, según el número de ganglios (37).

	SLE	SG
1 a 3 ganglios	55 %	60 %
4 a 9 ganglios	35 %	45 %
10 ó más ganglios	15 %	22 %

SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global

Un aspecto importante es la afectación de otras cadenas ganglionares distintas a la axilar, concretamente, la infraclavicular, la mamaria interna y la supraclavicular. Los ganglios infraclaviculares se consideran como N3 en la clasificación TNM y empeoran el pronóstico: en un estudio de tumores localmente avanzados, la SLE descendió del 68% al 50% cuando la ecografía detectaba adenopatías infraclaviculares (42). Los ganglios de la cadena mamaria interna parecen empeorar el pronóstico sólo cuando existe una afectación axilar concomitante (43). Los ganglios supraclaviculares condicionan una supervivencia muy pobre, de forma que llegaron a considerarse como

enfermedad diseminada en la clasificación TNM de 1997. Sin embargo, en la última edición de esta clasificación se han recolocado en N3, ya que el pronóstico es mejor que cuando existen metástasis a distancia (21). Un trabajo retrospectivo mostró que, si bien más de la mitad de las enfermas con ganglios supraclaviculares fallece a causa del tumor durante los tres primeros años, hay un 13% de supervivientes a largo plazo; en la enfermedad diseminada, la cifra no supera el 2%, por lo que parece adecuado que estas dos situaciones se clasifiquen de forma separada (44).

c) Grado histológico y nuclear

La asociación del grado histológico con el pronóstico del cáncer de mama ha sido debatida durante años debido a la subjetividad de éste parámetro y su posible dependencia del tamaño tumoral. En los últimos años se han establecido métodos de evaluación más fiables que han disminuido la subjetividad (38,45), y se han publicado varios estudios que han confirmado el valor pronóstico independiente del grado histológico en la enfermedad localizada. En enfermas sin afectación ganglionar la SLE se encuentra en el 90-100% para los grados 1 (bien diferenciado) y 2 (moderadamente diferenciado), y desciende al 69-88% para el grado 3 (pobremente diferenciado) (21,46,47).

Un estudio recientemente comunicado ha demostrado, tras determinar un perfil de expresión de 80 genes, que desde el punto de vista molecular tan solo existen dos grados (alto y bajo), ya que los tumores que eran catalogados como grado 2 desde el punto de vista histológico son en realidad una mezcla de tumores de alto y de bajo grado cuando se realiza la determinación del perfil génico (48). Es más, dentro de los tumores clasificados como grado 2 pueden dividirse en los que presentan un perfil génico similar a tumores grado 1 y otros que presentan un perfil génico similar a tumores grado 3. Los tumores “genéticamente” asimilables a tumores grado 1 presentan

una menor tasa de recaídas, mientras que los asimilables a tumores grado 3 tenían una tasa mayor de recaídas. Por tanto, estos resultados sugieren que debería establecerse un nuevo sistema de determinación del grado histológico, para que tuviera un mayor impacto en la predicción del pronóstico.

En los tumores invasivos actualmente se determina rutinariamente el grado histológico y el grado nuclear. Aunque en el carcinoma infiltrante el más estudiado ha sido el grado histológico, el grado nuclear también se ha asociado a otras variables relacionadas con el pronóstico, como el Her2/neu o el índice de proliferación (49). De todas formas, la principal aplicación del grado nuclear radica en la determinación del pronóstico del carcinoma *in situ* (50).

d) Edad

Las pacientes más jóvenes y las ancianas tienen peor pronóstico que las de edad intermedia, en cada caso por razones distintas, como se explica a continuación. Los estudios publicados tienen habitualmente unos límites de edad establecidos, que suelen situarse entre los 30 y los 40 años para las mujeres jóvenes y entre los 65 y los 75 años para las ancianas.

Un estudio con más de 800 tumores localizados encontró que las pacientes con menos de 40 años tenían una SLE peor que el resto, 64% frente a 88% (40). Dos series importantes mostraron que las mujeres menores de 35 años presentaban un riesgo particularmente elevado de recaída local cuando eran tratadas con cirugía conservadora (51,52). Otros dos grandes estudios retrospectivos indicaron que las mujeres menores de 35 años tenían con más frecuencia tumores con afectación ganglionar, RH negativos y grado histológico 3, aunque la edad continuó siendo un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante (53,54).

El cáncer de mama en las mujeres postmenopáusicas suele presentar RH positivos, Her2/neu negativo y baja tasa de proliferación, lo cual debería asociarse a una evolución más favorable (55). Sin embargo, se han comunicado tasas de supervivencia pobres en este grupo de enfermas, que podrían deberse a que el diagnóstico suele realizarse en etapas más avanzadas y con frecuencia no se llevan a cabo tratamientos óptimos. Debido a la comorbilidad asociada o a los propios deseos de las enfermas, muchas veces se les practica una cirugía insuficiente o no se les administra radioterapia ni quimioterapia adyuvante (56).

e) Receptores hormonales

Actualmente se considera que el principal papel de los dos RH, el receptor de estrógenos (RE) y el receptor de progesterona (RP), es la selección de las enfermas candidatas a un tratamiento hormonal. El requisito para administrar hormonoterapia a una paciente es que al menos uno de los dos receptores sea positivo. En la enfermedad localizada el tratamiento adyuvante con tamoxifeno se ha asociado con una mejor SLE y SG en enfermas con RE positivo, aunque los resultados son aún mejores si además expresan RP. Sin embargo, no se observado ningún beneficio en pacientes con RH negativos (57,58). La tasa de respuestas en la enfermedad avanzada es del 50-80% cuando los dos receptores son positivos, del 30-45% cuando uno de ellos es positivo, y del 5-10% cuando ninguno lo es (59).

Aunque su valor pronóstico continúa siendo ampliamente debatido, parece que su presencia es favorable de cara a la supervivencia. En un estudio que ya se ha comentado sobre tumores menores de 1 cm, la supervivencia se situaba entre el 92-97% cuando los RH eran positivos y bajaba al 90% cuando eran negativos (25). Un estudio italiano analizó la SLE a largo plazo en mujeres que sólo habían recibido tratamiento local, sin hormonoterapia, y en el estudio multivariante se observó que el RE era importante de

cara al pronóstico, pero sólo después del tercer año (60). El RP también se ha relacionado con el pronóstico, y en algunos estudios su peso ha sido incluso superior al del RE (61-62).

f) Her2/neu

Este gen codifica a una proteína transmembrana con actividad tirosín-kinasa, perteneciente a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. Tras la activación del Her2/neu se produce una dimerización y autofosforilación, que permite continuar la señalización intracelular a través de diferentes vías que terminarán estimulando la proliferación, la angiogénesis, la motilidad celular, la resistencia a la apoptosis y el desarrollo de metástasis (63). La sobre-expresión de Her2/neu, producida en un 90% de los casos por una amplificación génica, se ha detectado en el 20-30% de los carcinomas de mama infiltrantes y en la mayoría de los carcinomas *in situ* de alto grado, pero se observa casi exclusivamente en los carcinomas de origen ductal (64,65).

El gen y la proteína Her2/neu han sido ampliamente estudiados como factores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento. En pacientes con cáncer de mama y afectación ganglionar, la presencia de este receptor se ha asociado de manera independiente a una peor SLE y SG (66,67). Sin embargo, en enfermas con ganglios negativos existe una mayor controversia sobre el papel pronóstico de este parámetro (64,65,68-70), siendo de importancia sólo en algunos subgrupos concretos en parte de los estudios llevados a cabo. Por ejemplo, Allred y cols. observaron que en el subgrupo de enfermas con tumores menores de 3 cm, con RH positivos y sin un componente *in situ* significativo, la SLE a los 5 años disminuía de un 80% cuando el Her2/neu era negativo a un 40% cuando era positivo (69).

Una revisión bastante completa sobre los principales estudios realizados con Her2/neu en cáncer de mama parece confirmar la relación de este receptor con un mayor tasa de

recaídas (71). En esta revisión se analizaron los resultados de 81 estudios que incluían un total de 27.161 pacientes. En el 90% de los estudios se identificó una relación entre la amplificación del gen Her2/neu y un peor pronóstico, que se confirmó en el análisis multivariante en el 71% de los mismos.

Además de la implicación en el pronóstico, el Her2/neu juega un papel como factor predictivo de respuesta, tanto en la quimioterapia como en la hormonoterapia. La función predictiva más consolidada la realiza ante el trastuzumab, anticuerpo monoclonal frente al Her2/neu, que ha demostrado utilidad en la enfermedad metastásica (72,73), y, posteriormente, también en el tratamiento adyuvante (74,75). También se ha analizado su papel como factor predictivo de respuesta a determinados esquemas de quimioterapia adyuvante. Un análisis retrospectivo de varios ensayos importantes de quimioterapia adyuvante mostró que la sobre-expresión de Her-2/neu se asociaba a una menor eficacia del esquema de quimioterapia CMF (ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo) (58). Por otro lado, algunos estudios han encontrado que la sobre-expresión de Her-2/neu aumenta la sensibilidad a las antraciclinas (76), en probable relación con la expresión del gen de la enzima topoisomerasa alfa-II (77). Su papel en el desarrollo de resistencia a taxanos está menos definido (78).

Por otro lado, la sobre-expresión de Her-2/neu también suele asociarse a la ausencia de expresión de los RH (79,80). También se ha relacionado con una menor tasa de respuestas al tamoxifeno en tumores avanzados con RH positivos (71), por lo que se está evaluando el papel de los inhibidores de la aromatasa en esta situación. Un estudio de neoadyuvancia encontró que la tasa de respuestas era un 20% superior con letrozol que con tamoxifeno cuando el Her2/neu era positivo (79). Sin embargo, en el tratamiento adyuvante todavía no se ha confirmado la asociación entre Her2/neu y resistencia a tamoxifeno (81-83).

3.2. Elección del tratamiento adyuvante

A la hora de decidir el tratamiento complementario de una enferma intervenida de un cáncer de mama se han de tener en cuenta varios factores, que han sido expuestos en el apartado anterior. Algunos de estos factores tienen una marcada influencia en el pronóstico de la enfermedad, como el tamaño, el estado ganglionar, el grado de diferenciación y la edad. Otros, como los RH y el Her2/neu van a jugar un papel importante en la predicción de respuesta a determinados tratamientos. El panel de expertos de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) ha establecido que el estudio anatomopatológico diagnóstico de todo cáncer de mama debe incluir el tamaño del tumor primario, el número de ganglios afectados, el grado de diferenciación, los RH y el Her2/neu (84).

El tratamiento adyuvante del cáncer de mama se basa en tres pilares: la radioterapia, la hormonoterapia y la quimioterapia. La radioterapia sobre el tejido mamario se administrará siempre que se haya llevado a cabo una cirugía conservadora. También está indicada sobre la región axilar si hay 4 o más ganglios afectos o si se observa una extensión extracapsular en alguno de ellos, y sobre la pared torácica cuando el tumor sea mayor de 5 cm o infiltre la piel o el tejido muscular tras la realización de una mastectomía. Clásicamente, la radioterapia ha demostrado una reducción de la tasa de recaídas locales, pero no ha conseguido mejorar la supervivencia (85). Sin embargo, en algunos estudios más recientes se ha demostrado que la radioterapia también consigue aumentar la supervivencia global, especialmente en aquellas pacientes con un mayor riesgo de recaída (86, 87).

La decisión de pautar una hormonoterapia como tratamiento adyuvante se tomará en función de un único parámetro: los RH. La práctica totalidad de enfermas con RH

positivos recibirá un tratamiento hormonal, ya sea como único tratamiento sistémico o tras la administración de quimioterapia.

La indicación de la quimioterapia se decide teniendo en cuenta los principales factores pronósticos y predictivos de respuesta, pero los parámetros actualmente disponibles no permiten seleccionar adecuadamente a las enfermas, y la mayoría de ellas no se beneficiará del tratamiento. Los dos factores clínico-patológicos fundamentales de cara al pronóstico, el tamaño del tumor primario y el estado ganglionar, serán los parámetros que más influirán a la hora de decantarse por una quimioterapia. El grado histológico, la edad, los RH y el Her2/neu serán factores a considerar en enfermas con tumores pequeños y sin afectación ganglionar, pero aportan escasa información cuando los tumores son grandes o hay ganglios afectos (14).

Con el objetivo de intentar seleccionar mejor a las pacientes candidatas a un tratamiento con quimioterapia, hace más de 15 años se creó el índice pronóstico de Nottingham, que incluía tres factores pronósticos: estado ganglionar, tamaño del tumor y grado histológico (ver Tabla 6) (88). Los autores recomendaron la administración de quimioterapia adyuvante a las pacientes con un índice intermedio o desfavorable. Este índice ha sido validado posteriormente en varias series con gran número de enfermas (89,90), pero no es un método que sea habitualmente empleado en la clínica.

Tabla 6. Índice pronóstico de Nottingham: resultados de un estudio de validación sobre 402 pacientes seguidas durante una media de 15 años (90).

	Supervivencia global a 10 años
Grupo favorable: índice hasta 3'4	88 %
Grupo intermedio: índice 3'5 a 5'4	77 %
Grupo desfavorable: índice mayor de 5'4	40 %

$$\text{Índice Nottingham} = (\text{tamaño en cm.} \times 0'2) + \text{grado} + \text{ganglios}$$

Al grado se le asigna un valor de 1, 2 ó 3 según el grado de diferenciación correspondiente.

A los ganglios se les asigna un valor de 1 (no ganglios), 2 (1-3 ganglios) ó 3 (>3 ganglios).

Por otro lado, existen conferencias internacionales de consenso en las que expertos en cáncer de mama discuten las posibilidades terapéuticas en cada situación, para tratar de establecer criterios comunes. En el año 2000 el *National Institute of Health* (NIH) de EEUU organizó una de estas reuniones. En ella se estableció la recomendación de tratamiento con quimioterapia adyuvante a todas las mujeres con ganglios positivos y a aquéllas con ganglios negativos cuando el tamaño del tumor fuera mayor de 1 cm. En las enfermas con ganglios negativos y tumores menores de 1 cm la decisión de administrar quimioterapia debería individualizarse (85).

La conferencia de consenso más conocida se realiza cada 2 años en St. Gallen (Suiza), y en ella se definen grupos de riesgo de recaída en pacientes con ganglios negativos (Tabla 7), y se establecen unas recomendaciones de tratamiento según los factores pronósticos presentes (Tabla 8). Las últimas recomendaciones disponibles son del año 2007 (91), y son las que se reflejan en las siguientes tablas.

Tabla 7. Definición del riesgo de recaída de pacientes con cáncer de mama según el consenso de St. Gallen de 2007 (91).

Riesgo mínimo	<p>Sin afectación ganglionar, y TODAS las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pT < 2 cm - Grado 1 - Ausencia de invasión vascular peritumoral - Expresión de receptores hormonales - No sobreexpresión ni amplificación de Her2 - Edad > 35 años
Riesgo intermedio	<p>Sin afectación ganglionar, y al menos una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pT > 2 cm, o - Grado 2-3, o - Presencia de invasión vascular peritumoral, o - Ausencia de expresión de receptores hormonales, o - Sobreexpresión o amplificación de Her2, o - Edad < 35 años <p>Afectación de 1-3 ganglios, y</p> <ul style="list-style-type: none"> - Expresión de receptores hormonales, y - No sobreexpresión ni amplificación de Her2
Riesgo alto	<p>Afectación de 1-3 ganglios, y</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ausencia de expresión de receptores hormonales, o - Sobreexpresión o amplificación de Her2 <p>Afectación de 4 o más ganglios</p>

RE: receptor de estrógenos, RP: receptor de progesterona, pT: tamaño patológico del tumor.

Tabla 8. Tratamiento adyuvante sistémico en pacientes con cáncer de mama operable según consenso de St. Gallen de 2007 (91)

	Respondedor a tratamiento hormonal	Respuesta incierta a tratamiento hormonal	No respondedor a tratamiento hormonal
Her2 negativo	HT (considerar QT según riesgo de recaída)	HT (considerar QT según riesgo de recaída)	QT
Her2 positivo	HT + QT + Trastuzumab	HT + QT + Trastuzumab	QT + Trastuzumab

HT: hormonoterapia. QT: quimioterapia.

Como se puede observar en la Tabla 8, las recomendaciones de tratamiento sistémico de la reunión de St. Gallen incluyen varias opciones terapéuticas en determinados apartados. Además, la dificultad de la elección del tratamiento es aún mayor, ya que existen diversos tipos de tratamiento hormonal y diversos esquemas de quimioterapia posibles, como se expondrá más adelante.

Los criterios empleados habitualmente por la mayoría de los oncólogos para elegir el tratamiento adyuvante sistémico se podrían resumir de la siguiente manera:

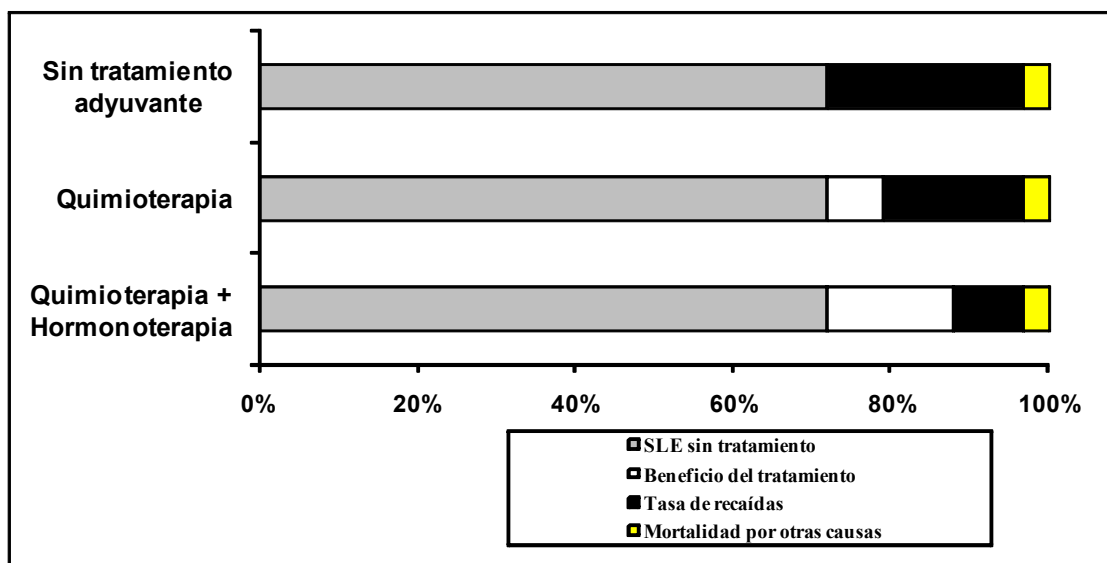
- **Hormonoterapia:** en principio se debe plantear a todas las enfermas con RE y/o RP positivos. Se administrará tras concluir la quimioterapia, en el caso de que se indiquen las dos.
- **Quimioterapia:** se planteará en las situaciones siguientes, siempre que no exista una comorbilidad importante:
 - o Ganglios positivos.

- Tumores mayores de 2 cm (aunque hay expertos que la consideran indicada en todos los tumores mayores de 1 cm).
- RH negativos.
- En tumores menores de 2 cm y sin afectación ganglionar cuando esté presente alguno de los siguientes factores: edad menor de 35 años, grado de diferenciación 2 o 3, o Her2/neu positivo.

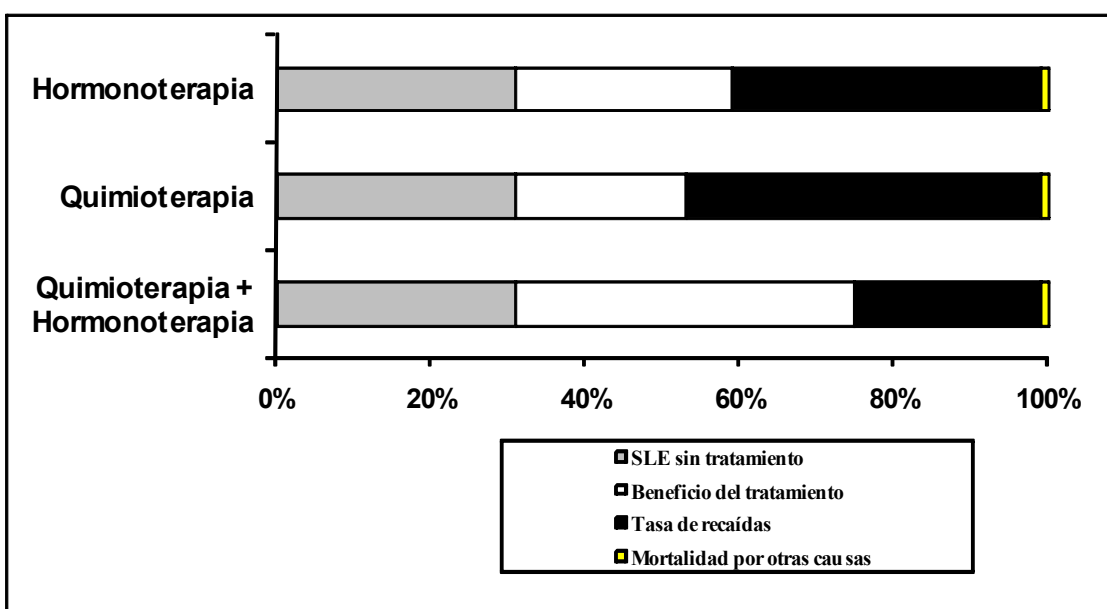
3.3 Hormonoterapia y quimioterapia adyuvante: opciones posibles, beneficio y toxicidad.

Aunque la hormonoterapia y la quimioterapia complementarias a la cirugía han conseguido mejorar considerablemente la supervivencia de las enfermas con cáncer de mama, la mayoría de las mujeres no obtendrán beneficio alguno de estos tratamientos, a lo que hay que añadir que en algunos casos se producirá una toxicidad nada despreciable. Actualmente la mayor parte de las enfermas intervenidas de un cáncer de mama recibirá algún tipo de tratamiento adyuvante sistémico: quimioterapia, hormonoterapia o ambas. La Figura 1 (1a y 1b) muestra el beneficio que ofrece la quimioterapia y la hormonoterapia en cuanto a SLE en dos tipos de enfermas con cáncer de mama con diferente pronóstico (92). Como se puede observar, el tratamiento adyuvante en enfermas que presentan varios factores de mal pronóstico consigue evitar la recaída en un número importante de casos (Figura 1b), pero la gran mayoría de las pacientes que tienen un pronóstico favorable no obtendrán un beneficio apreciable con este tratamiento (Figura 1a).

Figura 1 (1a y 1b). Estimación de la supervivencia libre de enfermedad a 10 años y beneficio del tratamiento adyuvante en 2 pacientes con diferente pronóstico, mediante el empleo del programa Adjuvant™ (92).



1a. Ejemplo de una enferma de 55 años con buen pronóstico (RH positivos, grado 2, tamaño menor de 2 cm, sin afectación ganglionar) tratada con QT con antraciclinas y anastrozol. Sin tratamiento adyuvante la SLE a 10 años sería de un 72%. Con anastrozol se evitaría la recaída de 12 de cada 100 enfermas con estas características; con quimioterapia (esquema FEC o similar) se evitaría en 7 de cada 100 enfermas; y con los dos tratamientos (quimioterapia y hormonoterapia) se beneficiarían 16 de cada 100 pacientes.



1b. Ejemplo de una enferma de 40 años con RH positivos, pero con otros factores de mal pronóstico (grado histológico 3, tamaño del tumor > 2cm, y afectación de 1 a 3 ganglios linfáticos). Sin tratamiento adyuvante la SLE a los 10 años sería de un 31%. Si se utilizara anastrozol se evitaría la recaída en 28 de cada 100 enfermas con estas características; un esquema de quimioterapia que tuviera un taxano y una antraciclina lograría evitarla en 22 de cada 100 enfermas; y si se administraran los dos tratamientos (quimioterapia y hormonoterapia) se beneficiarían 44 de cada 100 enfermas.

a) Hormonoterapia

El tipo de tratamiento hormonal variará dependiendo si la enferma es premenopáusica o postmenopáusica. En las mujeres premenopáusicas el tratamiento suele consistir en tamoxifeno y/o análogos de la LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante). En una revisión de 55 ensayos clínicos aleatorizados realizada por el *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) se concluyó que en mujeres menores de 50 años con RH positivos el tamoxifeno reducía en un 45% el riesgo de recaída y en un 32% el riesgo de muerte (57). El tratamiento con análogos de LHRH parece superior al tamoxifeno en las enfermas que no reciben quimioterapia (situación hoy en día excepcional en mujeres premenopáusicas), aunque los datos no son del todo concluyentes, y no se aclara la duda de si es mejor el tratamiento hormonal combinado que cualquiera de las opciones en solitario (93). Tras la realización de un tratamiento con quimioterapia, actualmente no existe un consenso sobre cuál es el mejor tratamiento hormonal: tamoxifeno, análogo de LHRH o combinación de ambos.

En enfermas postmenopáusicas el tratamiento estándar durante muchos años ha sido el tamoxifeno, que conseguía una reducción del riesgo de recidiva de un 37% en mujeres de 50 a 59 años y de un 54% en aquéllas de 60 a 69 años, y una reducción del riesgo de muerte de un 11% y un 33%, respectivamente (57). Datos de estudios recientes muestran que los inhibidores de la aromatasas (anastrozol, letrozol y exemestano), en sustitución del tamoxifeno o como terapia secuencial tras varios años de tratamiento con tamoxifeno, mejoran la SLE al compararlos con tamoxifeno solo (94-97). En 2005 la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) ha publicado una revisión de estos estudios, en la que se concluye que el tratamiento adyuvante de las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama y RH positivos debería incluir un inhibidor de la aromatasas, ya sea

en monoterapia durante 5 años, o bien, de manera secuencial tras varios años de tratamiento con tamoxifeno (98).

El tamoxifeno es un fármaco bien tolerado, aunque puede ocasionar diversos efectos secundarios. Los efectos más frecuentes, que aparecen a corto plazo, son sofocos, metrorragias y ganancia de peso. También puede producir amenorrea, leucorrea, náuseas, depresión, retinopatías y cataratas. A largo plazo se incrementa el riesgo de eventos tromboembólicos y de cáncer de endometrio, pero ejerce un efecto protector sobre el hueso disminuyendo la pérdida mineral ósea habitual en las mujeres postmenopáusicas (14). Los inhibidores de la aromatasa presentan un perfil de toxicidad distinto, con una menor incidencia de trombosis, tumores endometriales y sangrados vaginales, pero ocasionan con mayor frecuencia náuseas y dolor músculo-esquelético. Por otro lado, carecen del efecto protector óseo del tamoxifeno, observándose una mayor incidencia de osteoporosis y fracturas óseas (94). Los análogos de la LHRH producen habitualmente amenorrea y sofocos, y, con menor frecuencia, cefalea, depresión y artromialgias.

b) Quimioterapia

La quimioterapia adyuvante también ha conseguido disminuir la tasa de recaídas y mejorar la supervivencia de las enfermas con cáncer de mama. El meta-análisis llevado a cabo en 1998 por el EBCTCG mostró que en las pacientes menores de 50 años la quimioterapia disminuía el riesgo de recaída en un 35% y el riesgo de muerte en un 27%, lo que se traduce en una mejoría de la SG a 10 años de un 71% a un 78% en enfermas con ganglios negativos, y de un 42% a un 53% en enfermas con ganglios positivos. En las pacientes de 50 a 69 años el beneficio de la quimioterapia era menor, con una reducción del riesgo de recaída y de muerte de un 20% y un 11% respectivamente, lo que implica una mejoría de la SG a 10 años de un 67% a un 69% en

enfermas con ganglios negativos, y de un 46% a un 49% en enfermas con ganglios positivos (99).

Aunque el beneficio de la quimioterapia es más evidente en mujeres jóvenes y con afectación ganglionar, actualmente este tratamiento lo recibe un gran número de mujeres operadas de un cáncer de mama, aun cuando sean de mayor edad o se encuentren libres de afectación ganglionar. La elección de un esquema de tratamiento más o menos agresivo dependerá de los distintos factores pronósticos. Los esquemas de quimioterapia empleados con más frecuencia en la adyuvancia del cáncer de mama se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Esquemas de quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama.

Esquema sin antraciclinas CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate y 5-FU x 6 ciclos
Esquemas con antraciclinas FEC FAC AC	5-FU, Epirrubicina y Ciclofosfamida x 6 ciclos 5-FU, Adriamicina y Ciclofosfamida x 6 ciclos Adriamicina y Ciclofosfamida x 4 ciclos
Esquemas con taxanos TAC AC-Paclitaxel	Docetaxel, Adriamicina y Ciclofosfamida x 6 ciclos Adriamicina-Ciclofosfamida x 4 ciclos, seguido de Paclitaxel x 4 ciclos
Esquemas con densidad de dosis AC-Paclitaxel	Administrado cada 2 semanas

5-FU: 5-Fluorouracilo

Los estudios publicados indican que 6 ciclos de CMF son equivalentes a 4 ciclos de AC (100,101), pero probablemente inferiores a 6 ciclos de FAC o FEC (102,103). En la revisión del EBCTCG, en la que se analizaban 11 estudios aleatorizados que

comparaban tratamientos con y sin antraciclinas, se concluía que en el grupo global de enfermas los esquemas con antraciclinas son modestamente superiores en la reducción del riesgo de recurrencia y de muerte (12% y 11%, respectivamente) (97). Sin embargo, este beneficio es superior en enfermas con afectación ganglionar y en aquellas con ganglios negativos pero que presentan otros factores de mal pronóstico (102,104). Asimismo, las pacientes con Her2/neu positivo también pueden beneficiarse más de los regímenes con antraciclinas, ya que parecen presentar una mayor resistencia al esquema CMF que las enfermas con Her2/neu negativo (58,71,105).

En los últimos años se han publicado varios ensayos aleatorizados que señalan que los esquemas con taxanos y con mayor densidad de dosis mejoran los resultados en enfermas con ganglios positivos. El estudio de Henderson y cols., que comparaba el esquema AC x 4 seguido de paclitaxel x 4 frente a AC x 4, demostró en el brazo del paclitaxel una reducción del riesgo de recaída del 17% y una reducción del riesgo de muerte del 18% (106). Resultados concordantes se obtuvieron en el trabajo de Mamounas y cols., en el que, con los mismos esquemas de tratamiento que el ensayo anterior, demostró una mayor supervivencia libre de enfermedad y una reducción del riesgo de recaída de un 17% en el grupo de pacientes que recibieron paclitaxel (107). En el ensayo de Citron y cols. se observó que la administración de AC x 4 seguido de paclitaxel x 4 en intervalos de 2 semanas (dosis densas) conseguía una mejor SLE y SG comparado con el mismo esquema en administración trisemanal (108). Martín y cols. publicaron posteriormente el resultado de otro estudio que ha comparado el esquema FAC x 6 frente al esquema TAC x 6, consiguiéndose con el esquema que incluía docetaxel una reducción del riesgo de recaída del 28% y del riesgo de muerte del 30% (109).

Más recientemente, han sido comunicados los resultados de varios estudios que están evaluando el papel del trastuzumab en el tratamiento adyuvante de enfermas con sobre-expresión de Her2/neu. Se ha demostrado un beneficio espectacular en las pacientes tratadas con trastuzumab, con una reducción del riesgo de recaída del 49% a 3 años en los estudios americanos y del 36% a 2 años en el ensayo europeo (74,75). El incremento en supervivencia en estos ensayos ha sido del orden del 20%, tres veces superior al mejor resultado obtenido con la incorporación de los taxanos en adyuvancia.

La quimioterapia presenta una toxicidad importante, que, ocasionalmente, puede precisar incluso un ingreso hospitalario, y, de forma excepcional, puede provocar el fallecimiento de la enferma. En general, todos los quimioterápicos comparten una serie de efectos secundarios, que aparecerán habitualmente en mayor o menor medida: mielosupresión, náuseas, vómitos, astenia y alopecia. Además, cada grupo de fármacos tiene una toxicidad más específica: las antraciclinas son fármacos muy vesicantes y cardiotóxicos; los agentes alquilantes pueden inducir el desarrollo de leucemias agudas; y, respecto a los taxanos, el paclitaxel produce con más frecuencia neurotoxicidad, mialgias y reacciones de hipersensibilidad, y el docetaxel se asocia a mielosupresión severa, astenia importante, diarrea, lagrimeo y onicolisis (14).

4. OTROS FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA.

La información que ofrecen las características clínico-patológicas descritas previamente es limitada, ya que muchas enfermas con factores de buen pronóstico recaerán, mientras que otras con aparente mal pronóstico nunca lo harán. Con el objetivo de poder discriminar mejor el pronóstico de estas enfermas en los últimos años se han realizado numerosos estudios que han evaluado el papel de distintos factores moleculares.

a) Índice de proliferación

La actividad proliferativa del tumor se determina actualmente en la mayoría de los hospitales mediante inmunohistoquímica (con anticuerpos frente al antígeno nuclear Ki-67). Varios estudios han mostrado el valor pronóstico del índice proliferativo, duplicándose la tasa de recaídas cuando es superior al 5% (109,110). Un metaanálisis recientemente publicado que incluye 49 estudios y más de 12.000 pacientes ha puesto de manifiesto que, usando los distintos valores de corte para el índice proliferativo de cada uno de los estudios (en un rango que va del 3.5% al 36%), un índice elevado se asocia con un mayor riesgo de recaída y una menor supervivencia global, tanto en pacientes con ganglios negativos como en pacientes con ganglios positivos (111). Por lo tanto, este índice debe ser reflejado en el informe anatomopatológico de toda muestra de cáncer de mama, puesto que puede ser útil para la toma de decisiones en la práctica clínica diaria.

b) uPA y PAI-1

El activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) han sido involucrados en procesos de degradación de la matriz extracelular, adhesión y migración celular. uPA es una proteasa, que unida a su receptor, convierte el plasminógeno en plasmina. El inhibidor PAI-1 tiene un mecanismo de acción complejo y antagónico. Por un lado puede ejercer una acción antiproteolítica, y por otro, se ha observado que presenta una actividad angiogénica y su presencia es necesaria para que las células tumorales realicen una invasión óptima (112).

Varios trabajos, con un número importante de pacientes y seguimiento prolongado, han demostrado la relación entre la sobre-expresión de ambos parámetros y un peor pronóstico, con una significación estadística en los análisis multivariantes. En estos

estudios se observó que la SLE disminuía de un 65-85% cuando los valores de uPA eran bajos hasta un 45-50% cuando los valores estaban elevados, y de un 70-75% hasta un 35-45% cuando la expresión de PAI-1 estaba disminuida o aumentada, respectivamente (113-115). Un análisis de 8377 pacientes procedentes de varios ensayos clínicos de la *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) confirmó la validez pronóstica de estos dos factores. En el análisis multivariante la expresión elevada de uPA y PAI-1 fue el segundo mejor predictor de SLE y SG después de la afectación ganglionar para el grupo global de enfermas, y el más potente en el subgrupo de ganglios negativos (116). A pesar de estos prometedores resultados, la determinación de estos marcadores todavía no se ha incorporado al estudio rutinario de anatomía patológica, por lo que no disponemos de ellos para la toma de decisiones clínicas.

c) Ciclina E

La ciclina E regula la transición entre la fase G1 a la fase S del ciclo celular, de manera que niveles elevados de la misma aceleran esa transición y favorecen la proliferación celular. Es infrecuente la detección de una amplificación del gen de la ciclina E en el cáncer de mama, pero sí se ha observado una sobre-expresión de isoformas de bajo peso molecular de esta proteína, que se detectan en el 20%-30% de los tumores mamarios (117). Estas isoformas son más eficaces que la proteína completa en inducir la progresión del ciclo celular (118).

En un trabajo realizado con 395 enfermas, en el que se llevaba a cabo el análisis mediante *Western blot*, se observó una clara relación entre los niveles elevados de ciclina E (tanto la proteína total como las isoformas de bajo peso molecular) y un peor pronóstico. Tras una mediana de seguimiento de 6 años, todas las pacientes en estadio I con niveles bajos de ciclina E seguían vivas en el momento del análisis, mientras que todas las que sobre-expresaban la molécula habían fallecido. Globalmente a los 5 años,

la mediana de SLE fue de 91 meses en enfermas con valores bajos de ciclina E y de 17 meses en enfermas con valores altos (117). Posteriormente, un metaanálisis publicado recientemente que incluye más de 2500 pacientes parece confirmar estos resultados, puesto que niveles elevados de ciclina E se revelaron como factor pronóstico independiente, tanto para supervivencia libre de recaída como para supervivencia global (119). Sin embargo, estos datos tan interesantes requieren una validación en otras series antes de considerarlos adecuados para su utilización en la clínica (91).

d) Marcadores de angiogénesis

Los tumores mamarios de las pacientes que presentan metástasis ganglionares y los de aquellas que acaban desarrollando metástasis a distancia suelen estar más vascularizados (120,121). La determinación de la angiogénesis tumoral se puede realizar directamente, mediante el recuento de nuevos vasos sanguíneos (parámetro conocido como densidad microvascular), o, indirectamente, a través de los factores moleculares angiogénicos y sus receptores.

Weidner y cols. comunicaron por primera vez en 1992 que la densidad microvascular era un factor pronóstico independiente, relacionado con una peor SLE y SG en mujeres con cáncer de mama (122). En este estudio se incluyeron 165 enfermas de manera prospectiva, y en todas las que presentaron una alta densidad microvascular se había producido una recaída antes de los 33 meses, mientras que tan solo había ocurrido en el 5% de las enfermas con baja densidad microvascular. Posteriormente algunos estudios pudieron confirmar estos resultados (123,124), pero otros no (125,126), por lo que su valor pronóstico aun no está claramente establecido.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el principal factor inductor de la angiogénesis tumoral, y quizás también juegue un papel en la formación de vasos linfáticos. Varios estudios han observado una relación entre la expresión del VEGF y un

pronóstico desfavorable, tanto en enfermas con ganglios negativos como con ganglios positivos (127-129). Debido a que la mayoría son estudios retrospectivos y con un pequeño tamaño muestral todavía no se pueden realizar recomendaciones firmes sobre la utilidad de VEGF en el pronóstico del cáncer de mama (130).

e) p53

Este gen codifica a una proteína que tiene una función fundamental en la regulación de la división celular, la apoptosis, la estabilidad del genoma y la angiogénesis. Se han observado mutaciones de p53 en cerca de la mitad de los tumores humanos, y en el 20%-30% de los cánceres de mama (131), siendo éstas más frecuentes en los cánceres de mama con un componente familiar - hereditario.

La mayoría de las mutaciones de p53 producen un aumento de la estabilidad de la proteína, por lo que en muchos estudios la sobre-expresión de p53 se ha considerado equivalente a una alteración génica. Sin embargo, el hecho de que algunas mutaciones de p53 produzcan una disminución de la expresión de la proteína, indica que la evaluación de esta molécula por inmunohistoquímica puede conducir a interpretaciones erróneas (132).

Distintos estudios realizados con inmunohistoquímica han asociado la sobre-expresión de p53 con otros parámetros de mal pronóstico, como un alto grado nuclear, un alto índice de proliferación y receptores hormonales negativos. En algunos trabajos se ha sugerido que p53 podría actuar como un factor pronóstico independiente (133,134), pero en otros estudios perdía su valor cuando se realizaba un análisis multivariante (135,136). Por lo tanto, no existe un claro consenso acerca de su uso en la práctica clínica diaria.

También se ha estudiado el papel de p53 en la predicción de respuesta a quimioterapia. En un trabajo se observó que el 73% de las pacientes que presentaban una mutación de p53 tuvo una recaída de la enfermedad tras recibir una quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas (137). En otro estudio, realizado en un grupo de pacientes tratadas con adriamicina y docetaxel de forma neoadyuvante, la tasa de respuestas completas fue tan solo del 10% cuando existía una mutación de p53 frente al 45% cuando p53 era normal (138).

f) Catepsina-D

En el proceso de invasión y metástasis son necesarias algunas enzimas proteolíticas para que las células tumorales puedan atravesar la membrana basal y la matriz extracelular. Una de las enzimas que más se ha estudiado en este sentido es la catepsina-D, que presenta un destacado papel en el catabolismo proteico y la remodelación tisular (139). Se han publicado diversos estudios que han evaluado esta molécula en el cáncer de mama, algunos de los cuales mostraron una relación entre los niveles elevados de catepsina-D y un peor pronóstico (140,141), pero otros no consiguieron confirmar esa asociación (142,143). Un meta-análisis publicado en 1997, que incluyó 2690 pacientes de 11 estudios, estableció que la elevación de catepsina-D se asociaba a una mayor tasa de recaídas en mujeres con cáncer de mama y ganglios negativos, con un riesgo relativo de 0.61 (intervalo de confianza 95%: 0.52-0.73) (144). Sin embargo, en las últimas recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) sobre este asunto, no se aconseja su empleo en la toma de decisiones en la práctica clínica rutinaria (84).

g) Células tumorales circulantes

La presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica de mujeres con cáncer de mama se ha asociado a un peor pronóstico. Este valor pronóstico ha sido establecido

principalmente en el contexto de enfermedad metastásica (145,146), aunque parece que también podría ser de utilidad en el cáncer de mama precoz (147,148). En Estados Unidos se encuentra disponible un *kit* comercial que detecta la presencia de estas células tumorales circulantes en sangre periférica, denominado CellSearch. Su empleo hasta el momento se ha enfocado a la monitorización de la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer de mama metastásico, aunque ya existen datos sobre su empleo en la estimación del riesgo de recaída en pacientes con enfermedad localizada (149).

g) Otros genes

Las mutaciones de los genes BRCA-1 y BRCA-2 son responsables de los síndromes hereditarios más frecuentes de cáncer de mama y cáncer de ovario. Las pacientes portadoras de mutaciones en BRCA-1 podrían tener un peor pronóstico según algunos estudios, ya que sus tumores con mayor frecuencia son indiferenciados y con RH negativos (150,151). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado esta relación (152).

La expresión de Cox-2 también se ha relacionado con otros factores desfavorables, como un mayor tamaño, un índice proliferativo elevado, RH negativos o sobre-expresión de Her2/neu (153).

Otros factores moleculares con posible relación con el pronóstico del cáncer de mama, pero con menor trascendencia son: telomerasa (154), lisozima (155), survivina (156), maspina (157), c-myc (158), met (159), HIF-1 (160), HMGI-C (161) y TGF- β 1 (162).

5. PAPEL DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE MÚLTIPLES GENES

En los apartados previos hemos revisado la implicación individual de algunos genes en el pronóstico y en la predicción de respuesta a tratamientos del cáncer de mama. Sin embargo, actualmente existe una sólida evidencia de que el comportamiento de un

tumor no se puede estudiar adecuadamente con el análisis individual de los genes, ya que en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral se altera la expresión de cientos si no miles de genes (163). Actualmente, es posible llevar a cabo el estudio simultáneo de la expresión de un número elevado de genes en un tejido determinado, generando lo que se conoce como perfil de expresión génica o “huella molecular”. Esto ha supuesto un impulso importante en el conocimiento de una enfermedad tan heterogénea como el cáncer de mama, y ha permitido mejorar la información referente al pronóstico que pueden aportar los factores moleculares aislados.

En este apartado, inicialmente se describirán las principales técnicas disponibles en la actualidad para el análisis simultáneo de múltiples genes, y después se analizarán los principales estudios publicados relacionados con la evaluación del pronóstico y la predicción de respuesta a quimioterapia en el cáncer de mama.

5.1. Descripción de las técnicas de biología molecular

Las dos principales técnicas de análisis de expresión génica que se utilizan en oncología para el estudio del pronóstico y la predicción de respuesta a tratamientos son los *microarrays* o matrices de ADN y la RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa. Existen otras técnicas, como el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), que, de momento, presentan una menor aplicación clínica.

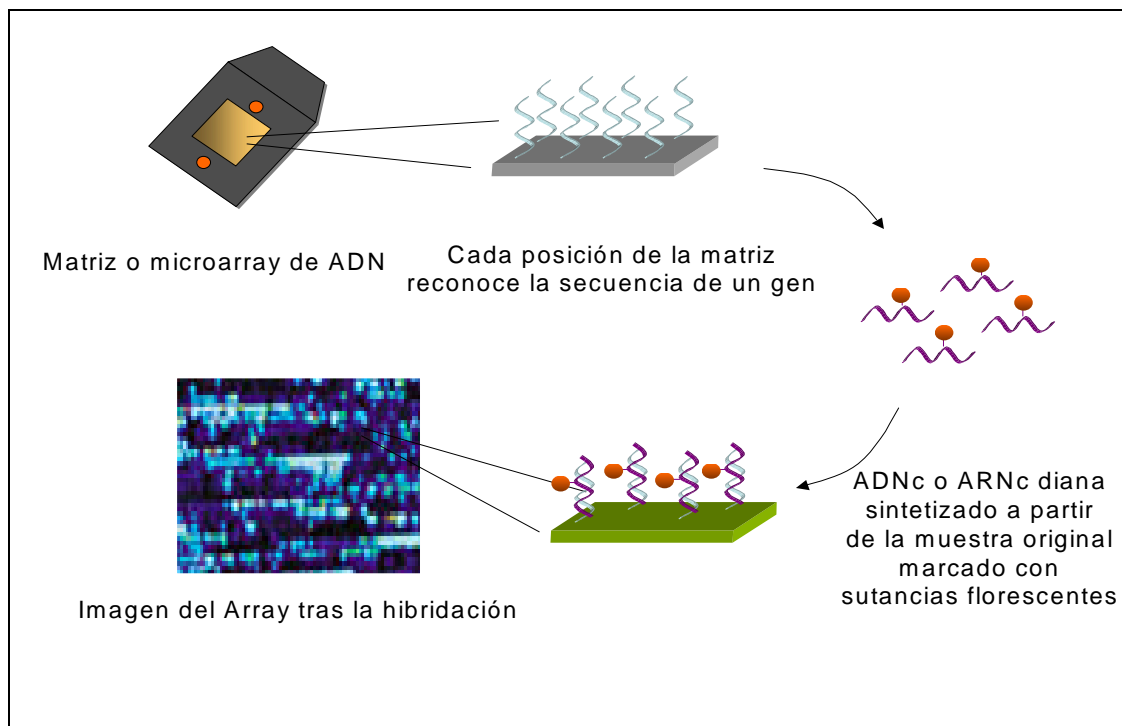
a) *Microarrays*

El método tradicional de medida del nivel de expresión de un gen ha sido el análisis de su ARN mensajero (ARNm) mediante hibridación, técnica conocida como *Northern blot*. Los *microarrays* de ADN fueron desarrollados en 1995 por Brown *et al*, y emplean los mismos principios básicos que el *Northern blot*, pero con la gran ventaja de permitir el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes (164).

El *microarray* está formado por una superficie de cristal, plástico o gel, similar a un portaobjetos de microscopía, sobre la que se depositan (*spotted arrays*) o sintetizan (*in situ arrays*) de manera ordenada secuencias de ADN, que pueden corresponder a genes conocidos o a segmentos de genes poco caracterizados. Existen *microarrays* que utilizan secuencias de ADN complementario (ADNc) y otros que emplean oligonucleótidos. También se pueden clasificar en función de la cantidad de genes estudiados, de forma que aquéllos que analizan el genoma completo se conocen como *arrays* de alta densidad, y los que realizan el estudio sobre un número más reducido de genes se denominan *arrays* de baja densidad (165,166).

El procedimiento técnico se inicia con la extracción del ARN total de las muestras que se quieran analizar, donde estarán representados todos los genes expresados en un tejido en un momento determinado. El ARN se convierte en ADNc o ARN complementario (ARNc), se amplifica y se marca con moléculas fluorescentes. Las moléculas de ADNc o ARNc marcadas hibridarán con las secuencias situadas en el *microarray* según el principio de complementariedad de bases de los ácidos nucleicos. Para analizar el nivel de expresión de cada uno de los genes de la muestra, se utiliza un escáner que mide el nivel de fluorescencia que transmiten las secuencias que han hibridado (Figura 2) (167).

Figura 2. Esquema del proceso experimental del análisis de la expresión génica con *microarrays*.



El análisis de los datos generados por un *micorarray* se realiza con sofisticados programas bio-informáticos y estadísticos, que proporcionan los perfiles de expresión génica de las muestras. Los métodos de análisis que se pueden emplear se agrupan en dos tipos principales (168,169):

- **Análisis no supervisado:** el objetivo de este análisis es identificar las posibles relaciones entre las muestras en base a la similitud en la expresión génica, sin tener en cuenta ninguna referencia previa sobre las características clínicas de los enfermos. El método empleado más frecuentemente es el agrupamiento jerárquico o *hierarchical clustering*, que consiste en crear grupos o *clusters* de muestras que tienen un perfil de expresión génica similar. Los resultados se muestran gráficamente en un dendrograma. El principal inconveniente de este

tipo de análisis es que pueden identificar subtipos tumorales que no tengan ninguna repercusión clínica, por lo que la utilidad de la información es limitada.

- **Análisis supervisado:** el objetivo de este análisis es la identificación de perfiles de expresión de genes que puedan clasificar las muestras en dos grupos diferenciados en base a ciertas características clínicas conocidas (recaída tumoral, respuesta a quimioterapia, presencia de RH, etc). Este tipo de análisis es el más indicado para identificar grupos de genes asociados al pronóstico del cáncer.

Tanto en los análisis no supervisados como en los supervisados es preciso realizar siempre una validación del resultado obtenido en una serie independiente, ya que habitualmente se analiza la expresión de miles de genes en unas pocas muestras, por lo que el azar podría justificar asociaciones sin significado biológico.

b) RT-PCR cuantitativa

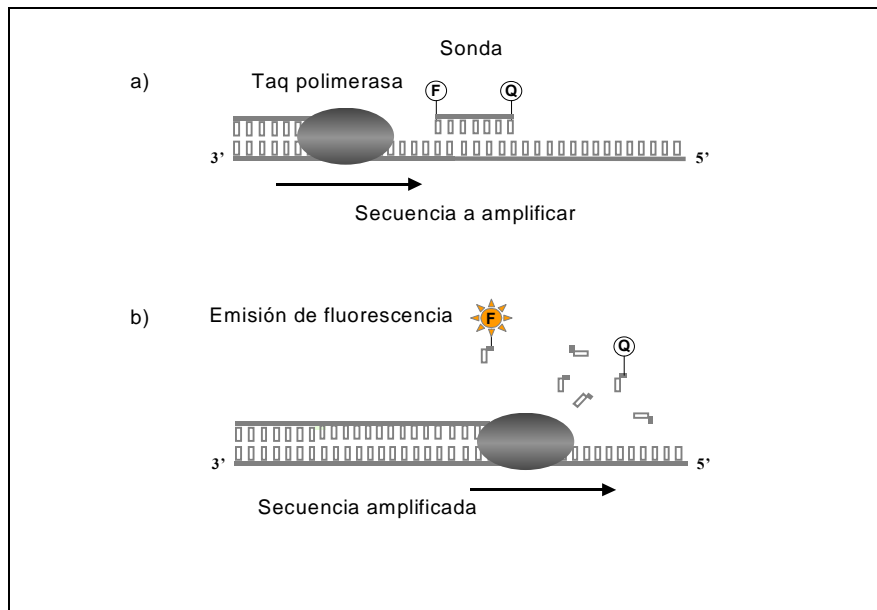
La PCR es, actualmente, una técnica de biología molecular fundamental para el estudio del ADN, ya que para analizar una determinada secuencia es preciso realizar inicialmente una amplificación de la misma, que permita una posterior reacción de secuenciación o una digestión con enzimas de restricción.

Esta técnica fue descrita por primera vez en 1985 (170). La reacción se lleva a cabo en un termociclador y consiste en la amplificación de una secuencia de ADN mediante la utilización de la enzima Taq polimerasa. Para que la enzima pueda comenzar a copiar la secuencia molde de ADN es necesaria la utilización de una pareja de oligonucleótidos, llamados cebadores o *primers*, que hibridarán específicamente con dicha secuencia. Cada ciclo de la reacción consta de los siguientes pasos:

- Desnaturalización de la doble cadena de ADN, que se realiza por calentamiento a 95°C.
- Anillamiento o hibridación de los oligonucleótidos a las cadenas sencillas (la temperatura es variable dependiendo de la secuencia del oligonucleótido).
- Copia de la cadena molde por la enzima Taq polimerasa, que se realiza a 72°C.

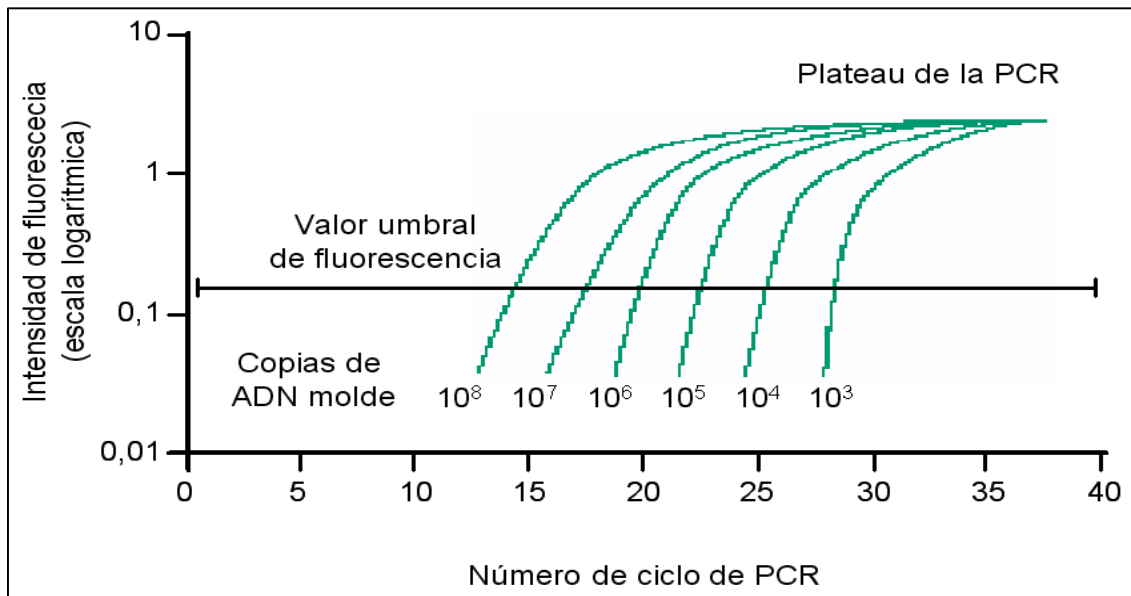
Al duplicarse la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo se producirá un aumento exponencial del número de copias del ADN problema, que facilitará el estudio posterior del mismo. La RT-PCR es un tipo de PCR que permite el análisis del ARNm mediante su conversión a ADNc por una enzima ADN polimerasa llamada transcriptasa reversa.

La RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) se ha desarrollado recientemente, y permite medir el producto de la PCR directamente a medida que se va acumulando (171). Además de los cebadores directo y reverso de la reacción de PCR, este sistema utiliza una sonda, que consiste en un oligonucleótido complementario a la secuencia a amplificar marcado con una sustancia fluorescente (F) y una sustancia (Q) que suprime esa fluorescencia. Durante la fase de extensión de la PCR no existe fluorescencia mientras la sonda esté intacta, ya que es suprimida por la proximidad de la sustancia Q. Una vez que la amplificación se produce, la sonda se degrada por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa, y la sustancia fluorescente deja de ser suprimida por la sustancia Q (Figura 3).

Figura 3. Emisión de fluorescencia en la reacción de qRT-PCR.

De esta forma, con cada ciclo de la PCR se producirá un incremento en la señal fluorescente hasta que la curva alcanza una meseta o *plateau* (167). El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar (Figura 4) (172,173).

Figura 4. Curvas patrón de qRT-PCR. Se representa la relación inversa entre la cantidad de ADN de la muestra y el ciclo umbral (Ct).



El análisis de expresión génica mediante la qRT-PCR se puede realizar de dos maneras. En una de ellas se comparan los resultados obtenidos con un determinado gen con varias curvas patrón que representen a distintas cantidades de ADN de esa secuencia. Sin embargo, el método de análisis que tiene una mayor aplicación en oncología es la comparación de los niveles de expresión de un determinado gen entre dos o más muestras, para identificar el número de veces que se expresa más o menos un gen en una muestra respecto a la otra (167).

En los últimos años, la empresa *Applied Biosystems* ha desarrollado un producto para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR denominado *Taqman Gene Expression Assays*. Se trata de una colección de cebadores y sondas prediseñados que permiten la cuantificación específica de cualquier gen descrito en las bases de datos. Además, la misma empresa ha creado un nuevo dispositivo que consiste en una tarjeta microfluídica (denominada *Taqman Low Density Array*) que permite realizar el análisis de la

expresión génica de múltiples genes simultáneamente (Figura 5). Tras realizar la selección de genes que se desean estudiar, el investigador elegirá los cebadores y las sondas correspondientes, y éstos serán incorporados a la tarjeta microfluídica para realizar el análisis de expresión (167).

Figura 5. Tarjeta microfluídica (*Taqman Low Density Array*).



5.2. Aplicaciones de los análisis de múltiples genes en el cáncer de mama

Golub *et al* (174) establecieron hace años tres tipos de estudios de múltiples genes que podían realizarse en oncología, en función de los objetivos planteados en cada caso:

- Estudios de descubrimiento de clase (*class discovery*): el objetivo es la determinación de diversas agrupaciones de muestras con un patrón de expresión génica homogéneo y diferenciado de otras. En estos estudios, las clases no están predefinidas ni se aporta ninguna información clínica sobre las muestras, por lo que se realizan con análisis no supervisados.
- Estudios de comparación de clase (*class comparison*): tienen como objetivo la investigación de diferencias en los perfiles de expresión de genes entre distintos

tipos de muestras predeterminadas. En estos casos las clases que se comparan están previamente definidas independientemente de la expresión génica, por lo que se utilizan análisis supervisados.

- Estudios de predicción de clase (*class prediction*): el diseño de éstos es similar a los de comparación de clase, ya que las clases están previamente predefinidas y se utilizan análisis supervisados. Sin embargo, en este caso el objetivo principal es desarrollar una función de clasificación que permita predecir con precisión el grupo biológico, la categoría diagnóstica o el pronóstico de un paciente a partir del perfil de expresión de genes de un tejido de ese paciente.

El análisis de perfiles de expresión génica en tumores de mama ha motivado la publicación de numerosos trabajos con diversas aplicaciones: estudio de genes implicados en la carcinogénesis y la progresión tumoral, clasificación de tumores en función de los genes expresados, predicción de respuesta a la quimioterapia y determinación del pronóstico. De todos ellos, los estudios con mayor relevancia clínica hasta el momento son los que han establecido perfiles asociados al pronóstico y a la predicción de respuesta (que pertenecen a la modalidad de “estudios de predicción de clase”), que se analizarán posteriormente con detalle.

Los primeros estudios realizados con análisis de múltiples genes permitieron demostrar que tumores de mama con distintas características anatomopatológicas podían también distinguirse mediante la determinación del perfil génico. Anteriormente ya se han comentado estudios de perfiles génicos que diferenciaban las distintas etapas histológicas de la carcinogénesis (7-9), los grados de diferenciación (48), y los tipos histológicos más frecuentes del cáncer de mama (carcinoma ductal y lobulillar) (175). Por otro lado, varios investigadores independientes han demostrado que los tumores con

RE positivo presentan un perfil de expresión génica diferente a los tumores con RE negativo (176,177).

En los últimos años se han publicado varios trabajos en los que se ha tratado de realizar una clasificación del cáncer de mama diferenciando varios subtipos en función de los perfiles de expresión génica que presentaban. Perou y cols. analizaron 43 muestras de mama mediante la utilización de *microarrays* de ADNc de 8102 genes. Se seleccionaron 427 genes que fueron capaces de distinguir 4 subtipos histológicos mamarios con una expresión génica claramente diferenciada: “ER+/luminal-like”, “basal-like”, “Erb-B2+” y “tejido mamario normal”. Mientras que los tumores con RE positivo presentaban el mismo perfil génico (“ER+/luminal-like”), los tumores con RE negativo se repartían en 2 subtipos con comportamiento biológico distinto (“basal-like” y “Erb-B2+”) (178). El mismo grupo publicó un año más tarde otro estudio con 85 muestras de mama, en el se describieron otros 2 subtipos con distinto perfil génico dentro de los tumores identificados como “ER+/luminal-like”: “luminal A” y “luminal B” (179). Estos hallazgos fueron validados en una serie más amplia del mismo grupo, y en otras dos series independientes (180).

a) Predicción del pronóstico

En un estudio realizado en un modelo animal se observó que la aparición de metástasis de cáncer de mama en órganos concretos dependía de la acción conjunta de varios genes, cada uno de los cuales era incapaz de originar la diseminación por sí solo (181). Un trabajo clínico que analizaba cuatro genes también apoyaba la necesidad de una colaboración entre los mismos para producir metástasis (182). Esto indica que un determinado gen puede ser condición necesaria pero no suficiente para desarrollar la diseminación de la enfermedad. Por ello, los análisis simultáneos de un gran número de

genes pueden mejorar la información pronóstica que ofrecen los factores moleculares aislados.

En los últimos años se han publicado varios trabajos que han establecido distintos perfiles génicos asociados al pronóstico del cáncer de mama. Uno de los perfiles de genes que ha tenido una mayor repercusión se determinó en un estudio comunicado en el año 2002 por un grupo holandés, a través de dos publicaciones. En la primera de ellas analizaron los tumores de 117 enfermas mediante *microarrays* de aproximadamente 25.000 oligonucleótidos, y se identificó un perfil de 70 “genes” (que en realidad eran oligonucleótidos) que predecía las recaídas a distancia en pacientes sin afectación ganglionar (183). Posteriormente, validaron este perfil en 295 pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, con y sin afectación ganglionar. La supervivencia libre de metástasis a los 10 años fue del 50.6% en el grupo con un perfil de mal pronóstico y del 85.2% en el grupo con un perfil favorable ($p<0.001$), mientras que la SG fue del 54.6% frente al 94.5%, respectivamente ($p<0.001$). La información pronóstica que ofreció este perfil fue independiente de la relativa a los ganglios axilares, es decir, algunas pacientes sin afectación axilar que hubieran sido consideradas como de buen pronóstico pertenecían al grupo de perfil génico desfavorable y tuvieron una recaída de la enfermedad (184). Este perfil genético con capacidad de predicción pronóstica ha sido comercializado con el nombre de *Mammaprint*, y ha sido validado posteriormente en varios trabajos.

Uno de ellos, realizado por Glas y cols. (185), reanalizó 145 pacientes del estudio de van de Vijver (184), aunque con un método diferente de cuantificación y análisis de ARN, confirmando los resultados obtenidos en el estudio original. Posteriormente, también se realizó una validación en un estudio europeo multicéntrico, con 302 pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante, ni quimioterapia ni hormonoterapia

(186). Los resultados de este trabajo demostraron que el perfil genético fue superior en predicción pronóstica al empleo de la herramienta informática Adjuvant! Online (92), sobre todo en pacientes de alto riesgo.

Otro estudio en el que se valida la capacidad pronóstica de este perfil fue llevado a cabo por nuestro grupo. En este trabajo se confirma el rendimiento del perfil holandés en una muestra independiente de 96 pacientes, mediante una técnica alternativa (qRT-PCR), y se observa que se diferencian dos grupos con un riesgo claramente diferenciado de recaída, a pesar de emplearse únicamente 60 de los 70 genes empleados en el trabajo original (187).

Otro perfil de genes recientemente publicado ha sido el desarrollado por Wang y cols., que también conseguía discriminar dos grupos de enfermas con diferente riesgo de metástasis, con un *Hazard Ratio* (HR) de 5,67 (intervalo de confianza del 95%: 2,59-12,4). El análisis inicial se realizó en 115 enfermas con ganglios negativos, utilizando *microarrays* de unos 22.000 oligonucleótidos, y posteriormente se validó en una serie independiente de 171 pacientes, también con ganglios negativos. En este caso, el perfil estaba formado por 76 “genes” (oligonucleótidos), de los que 60 eran necesarios para determinar el pronóstico de las enfermas con tumores con RH positivos, y 16 para las que tenían tumores con RH negativos (188). Este perfil también ha sido validado en otros estudios, como el llevado a cabo por Foekens y cols. (189), que analizó muestras congeladas de 180 casos de cáncer de mama, confirmando la importante capacidad de predicción pronóstica de este perfil, o en el más reciente de Desmedt y cols. (190), que analizó de forma independiente otras 198 pacientes, y que confirmó estos resultados. Sin embargo, al contrario que el perfil anterior, no se ha desarrollado hasta el momento una versión comercial de este perfil pronóstico.

Al contrario que estos dos perfiles pronósticos, que se han desarrollado principalmente en el ámbito europeo, el perfil publicado por Paik y cols. ha sido desarrollado en Estados Unidos. Este perfil pronóstico incluye un total de 21 genes, y en el estudio original (191) se llevó a cabo el análisis de 668 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama sin afectación axilar, y que recibieron tamoxifeno como tratamiento adyuvante. La técnica empleada fue RT-PCR sobre muestras conservadas en parafina. El perfil estableció una puntuación que determinaba el riesgo de recaída de las pacientes en alto, intermedio y bajo, siendo este predictor pronóstico el más importante de todos los que se analizaron en el estudio, por encima de los factores clásicos como afectación ganglionar o tamaño tumoral.

Comercializado bajo el nombre de *Oncotype DX*, este perfil ha sido validado en estudios posteriores. En el trabajo publicado por Habel y cols. (192), un estudio caso-control en el que se analizaron 220 casos que fallecieron por cáncer de mama en relación con 570 controles de similares características clínicas que permanecían vivos cuando sus casos respectivos habían ya fallecido, se observó que la clasificación establecida por el perfil en grupo de alto, intermedio o bajo riesgo de recaída se correlacionaba con el riesgo de muerte por cáncer de mama en pacientes con receptores hormonales positivos, tanto si habían recibido adyuvancia con tamoxifeno como si no la habían recibido.

Por último, otro perfil de interés que ha surgido en los últimos años es el publicado por Ma y cols. (193), que incluye únicamente dos genes. Este estudio analiza 60 casos de cáncer de mama con receptores hormonales positivos, con o sin afectación ganglionar, y tratados con tamoxifeno. La expresión elevada de uno de estos genes, *HOXB13*, se asociaba a mayor riesgo de recaída, mientras que si se observaba sobreexpresión del otro gen, *IL17BR*, existía un riesgo mínimo de recaída. Posteriormente, en una validación sobre una muestra de 852 pacientes con cáncer de mama estadio I o II, este

perfil presentó valor predictivo pronóstico únicamente en las pacientes con receptores hormonales positivos y sin afectación ganglionar (194). Estos resultados han sido confirmados en otros estudios posteriores (195,196).

b) Predicción de la respuesta a quimioterapia y hormonoterapia

Una de las aplicaciones más importantes de los análisis de múltiples genes es la predicción de la respuesta a determinados tratamientos antineoplásicos. Un mismo fármaco administrado a dos enfermas con cáncer de mama puede lograr una eficacia muy distinta de una a otra. La mejor manera de experimentar *in vivo* la eficacia de la quimioterapia o la hormonoterapia es a través de un tratamiento neoadyuvante, que nos permitirá analizar las características moleculares del tumor previas a la administración del fármaco, y posteriormente evaluar la tasa de respuestas desde el punto de vista microscópico. El parámetro que nos indica la mayor eficacia posible del tratamiento es la tasa de respuestas completas patológicas (es decir, cuando no queda ningún resto tumoral microscópico en la pieza extirpada), que se ha relacionado de manera consistente con una mayor supervivencia (197,198).

Los primeros estudios publicados con perfiles génicos predictivos de respuesta a quimioterapia se realizaron con un número escaso de enfermas. Sotiriou y cols. utilizaron microarrays de ADNc en muestras de 10 tumores mamarios obtenidas mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF), e identificaron un perfil de 37 genes con una expresión diferenciada en función de la respuesta que se obtenía a una quimioterapia neoadyuvante con adriamicina y ciclofosfamida (199). Por otro lado, Chang y cols. establecieron un perfil de 92 genes predictivo de respuesta a docetaxel, administrado como tratamiento neoadyuvante en 24 enfermas con cáncer de mama, con un 90% de especificidad y un 85% de sensibilidad (200). En otro estudio realizado en 37 mujeres con cáncer de mama inflamatorio se analizaron las muestras tumorales con

microarrays de 8000 genes, identificándose un perfil de 85 genes que dividía a las enfermas en dos grupos con una tasa de respuestas completas patológicas a una quimioterapia neoadyuvante (basada en antraciclinas) claramente diferentes (70% versus 0%) (201). Todos estos perfiles no fueron validados posteriormente.

El grupo del MD Anderson Cancer Center de Houston publicó en 2004 un trabajo en el que estudiaron muestras tumorales obtenidas mediante PAAF de 42 enfermas con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante con paclitaxel semanal seguido de FAC. Tras analizar las muestras de 24 pacientes con microarrays de ADNc (que contenían 30721 oligonucleótidos) se identificó un perfil de 74 genes que predecía la respuesta patológica completa, con una sensibilidad del 43% y una especificidad del 100%. El perfil fue validado posteriormente en las 18 enfermas restantes (202).

Más recientemente, Iwao-Koizumi y cols. han comunicado otro estudio realizado en 44 mujeres que recibieron docetaxel como tratamiento neoadyuvante de un tumor de mama primario o de una recidiva local. En este caso el estudio se realizó con PCR cuantitativa, que permitió el estudio simultáneo de 2453 genes. Se identificaron 85 genes con una expresión diferenciada entre los respondedores y los no respondedores, con los que se creó un sistema predictivo de respuesta a docetaxel, que fue validado posteriormente en otras 26 enfermas (203). Hay que resaltar que de los 85 genes tan solo 4 coincidían con los identificados por microarrays, como predictivos de respuesta a docetaxel, en el estudio de Chang descrito previamente (200).

Empleando específicamente *Oncotype DX*, existen estudios que han relacionado una puntuación elevada, es decir, un alto riesgo de recaída, con una mayor respuesta al tratamiento quimioterápico (204,205), pero otros estudios no han confirmado estos resultados (206). No hay estudios que hayan investigado el papel de *Mammaprint* como predictor de respuesta a tratamiento quimioterápico.

También se han realizado estudios que han analizado perfiles génicos predictivos de respuesta a hormonoterapia, concretamente a tamoxifeno. Tanto el estudio de Paik (191) como el de Ma (193), que como ya hemos comentado obtienen unos perfiles con valor predictivo del riesgo de recaída, pueden ser considerados así mismo estudios de predicción de respuesta a hormonoterapia, pues todas las pacientes incluidas recibieron tamoxifeno como tratamiento adyuvante. Esto se fundamenta en parte en los resultados del trabajo de Esteva y cols (207). En este estudio se empleó *Oncotype DX* para predecir el riesgo de recaída en pacientes con cáncer de mama sin afectación axilar que no recibieron tratamiento adyuvante de ningún tipo, y se observó que en estas pacientes la puntuación obtenida según *Oncotype DX* no se relacionaba con el riesgo de recurrencia a distancia. Estos datos pueden hacer pensar que este perfil no es tanto un predictor pronóstico como de respuesta a tamoxifeno. En otro estudio, realizado en 46 enfermas con cáncer de mama avanzado con RH positivos tratadas con tamoxifeno, se identificó otro perfil de 44 genes que diferenciaba los tumores sensibles de los resistentes a tamoxifeno. El resultado fue validado por los mismos investigadores en otras 66 enfermas (208).

Por tanto, es evidente que en este campo de conocimiento han existido avances significativos en los últimos años. Sin embargo, la ausencia de validación externa de algunos de estos perfiles y la ausencia, hasta el momento, de evidencia suficiente para su empleo en la práctica clínica diaria, hacen que aun sea necesario un mayor esfuerzo en la investigación del posible papel de los perfiles génicos para ayudarnos a estimar de una forma más precisa el riesgo de recaída de nuestras pacientes con cáncer de mama y, por lo tanto, poder ofrecerles el mejor tratamiento posible en cada caso.

Hipótesis y objetivos

Los perfiles de expresión génica parecen tener un papel en la estimación del riesgo de recaída de las mujeres operadas de cáncer de mama. En los últimos años los estudios sobre este tema han abierto el debate sobre si estos perfiles génicos pueden llegar a ser superiores en su propósito a los factores clínicos clásicos empleado en la práctica diaria. Estos estudios no han sido validados mediante el empleo de una técnica alternativa o en un material diferente del utilizado en el estudio original.

1. HIPÓTESIS.

La hipótesis de trabajo fue que, mediante qRT-PCR a partir de muestras conservadas en parafina, y a través del empleo de “kits” comerciales disponibles, era posible reproducir y validar los resultados que se habían obtenido con los tres perfiles génicos analizados en este estudio.

Las hipótesis estadísticas se definieron de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: el empleo de qRT-PCR a partir de muestras conservadas en parafina no reproduce los resultados obtenidos por los tres perfiles génicos en cuanto a la estimación del riesgo de recaída en nuestra muestra de pacientes.
- Hipótesis alternativa: el análisis mediante qRT-PCR a partir de muestras conservadas en parafina es factible para el estudio de los tres perfiles génicos, conservando su capacidad de predicción pronóstica en nuestra muestra de pacientes.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo principal.

- Validar los resultados obtenidos por los tres perfiles génicos en sus trabajos originales en cuanto a la estimación del riesgo de recaída en una muestra independiente, con una técnica alternativa, y a partir de material conservado en parafina.

2.2. Objetivos secundarios.

- Analizar el valor pronóstico de cada uno de los tres perfiles génicos.
- Comparar el funcionamiento de los tres perfiles génicos entre sí, en una muestra independiente de pacientes.
- Determinar la independencia de los perfiles génicos respecto del resto de variables con valor pronóstico.
- Contrastar el valor de los perfiles génicos con el de los factores empleados habitualmente en la clínica, incluido el cálculo de recaída estimado mediante AdjuvantTM.
- Examinar el rendimiento de los perfiles génicos en el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar.

Material y Métodos

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS ENFERMAS

En la primera fase del estudio se recogieron de manera retrospectiva las características clínicas y anatomopatológicas de 153 pacientes diagnosticadas entre 1996 y 2002 de un carcinoma de mama ductal infiltrante. Se establecieron los siguientes criterios de inclusión (Tabla 10):

Tabla 10. Criterios de inclusión.

- Diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama ductal infiltrante.
- Estadio I o II anatomopatológico según la clasificación TNM de 2002.
- Muestra conservada en parafina disponible.
- Receptores hormonales positivos.
- Tratamiento óptimo, definido como:
 - Mastectomía o cirugía conservadora, con márgenes quirúrgicos libres de infiltración.
 - Radioterapia mamaria tras una cirugía conservadora.
 - Hormonoterapia.
- Seguimiento clínico superior a 60 meses (excepto en casos de recidiva precoz).
- Ausencia de cáncer de mama contralateral.

Todos los tumores incluidos en el estudio correspondían a los estadios I y II, definidos según el sistema de estadificación anatomopatológico TNM de la AJCC versión de 2002. Fueron excluidos los tumores con receptores hormonales negativos o desconocidos. Así mismo, también fueron excluidos los casos que no hubieran recibido hormonoterapia como parte de su tratamiento, puesto que estos casos habrían recibido un tratamiento subóptimo.

Las características clínicas y anatomopatológicas que se recogieron de manera retrospectiva fueron:

- Edad al diagnóstico (años).
- Fecha del diagnóstico.
- Tipo histológico: sólo se admitieron los casos de carcinoma ductal infiltrante.
- Tamaño del tumor primario (mm).
- Estado de los ganglios axilares: afectos (positivos) o no (negativos).
- Número de ganglios afectos.
- Grado de diferenciación: 1, 2 o 3.
- Receptores hormonales: para su entrada en el análisis, el caso debía presentar positividad al menos para el receptor de estrógenos.
- Tratamiento adyuvante: quimioterapia (señalando el esquema administrado en cada caso), hormonoterapia y/o radioterapia.
- Fecha de la recaída.
- Localización inicial de la recaída: loco-regional o a distancia (con especificación de los órganos afectados).
- Supervivencia libre de recaída (SLR): tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la recaída.
- Supervivencia global (SG): tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la última visita o hasta el fallecimiento de la enferma.

2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA CON VALOR PRONÓSTICO.

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron genes con validez pronóstica, incluidos dentro de los principales perfiles que han sido analizados hasta el momento. En la tabla 11 se incluyen los extraídos del perfil holandés de 70 genes publicado por van't Veer y

cols. (183). Dado que el estudio se realizó con productos comerciales, sólo pudieron ser analizados 60 de los 70 genes del trabajo original, ya que para el resto no existe un ensayo comercial disponible.

Tabla 11. Genes analizados extraídos del perfil publicado por van't Veer y cols.

Número de orden	Nombre del gen	GenBank / RefSeq	Número de identificación del ensayo
1	ALDH4A1	NM_003748.2	Hs00186689_m1
2	AP2B1	NM_001282.2	Hs00426694_m1
3	BBC3	NM_014417.2	Hs00248075_m1
4	C20orf46	NM_018354.1	Hs00217957_m1
5	CCNE2	NM_057749.1	Hs00372959_m1
6	CDC42BPA	NM_014826.4	Hs00207976_m1
7	CDCA7	NM_145810.2	Hs00230589_m1
8	CENPA	NM_001809.3	Hs00156455_m1
9	COL4A2	NM_001846.2	Hs00300500_m1
10	C16orf61	NM_020188.2	Hs00220174_m1
11	DCK	NM_000788.1	Hs00176127_m1
12	ECT2	NM_018098.4	Hs00216455_m1
13	EGLN1	NM_022051.1	Hs00254392_m1
14	ESM1	NM_007036.3	Hs00199831_m1
15	EXT1	NM_000127.2	Hs00609162_m1
16	FBXO31	NM_024735.2	Hs00375554_m1
17	FGF18	NM_003862.1	Hs00818572_m1
18	AYTL2	NM_024830.3	Hs00227357_m1
19	FLT1	NM_002019.3	Hs00176573_m1
20	GMPS	NM_003875.2	Hs00269500_m1
21	GNAZ	NM_002073.2	Hs00157731_m1
22	GPR126	NM_020455.4	Hs00607475_m1
23	GSTM3	NM_000849.3	Hs00356079_m1
24	HRASLS	NM_020386.2	Hs00220624_m1
25	IGFBP5	NM_000599.2	Hs00181213_m1
26	GPR180	NM_180989.4	Hs00737079_m1
27	EBF4	NM_020833.2	Hs00325662_m1
28	NDC80	NM_006101.1	Hs00196101_m1
29	DHX58	NM_024119.2	Hs00225561_m1
30	MTDH	NM_178812.2	Hs00757841_m1
31	MCM6	NM_005915.4	Hs00195504_m1
32	MELK	NM_014791.2	Hs00207681_m1

33	C9orf30	NM_080655.1	Hs00741614_mH
34	MMP9	NM_004994.2	Hs00234579_m1
35	MS4A7	NM_021201.4	Hs00221867_m1
36	NMU	NM_006681.1	Hs00183624_m1
37	NUSAP1	NM_018454.5	Hs00251213_m1
38	ORC6L	NM_014321.2	Hs00204876_m1
39	OXCT1	NM_000436.3	Hs00166467_m1
40	AKAP2	NM_007203.3	Hs00200512_m1
41	PECI	NM_006117.2	Hs00196146_m1
42	PITRM1	NM_014889.2	Hs00208485_m1
43	PQLC2	NM_001040125.1	Hs00214894_m1
44	PRC1	NM_003981.2	Hs00187740_m1
45	QSOX2	NM_181701.3	Hs00326547_s1
46	RAB6B	NM_016577.3	Hs00213147_m1
47	DTL	NM_016448.1	Hs00212788_m1
48	MYO15B	NR_003587.1	Hs00227939_m1
49	RFC4	NM_181573.1	Hs00427469_m1
50	RTN4RL1	NM_178568.2	Hs00604876_s1
51	RUNDC1	NM_173079.1	Hs00405433_m1
52	SERF1A	NM_021967.1	Hs00743093_s1
53	SLC2A3	NM_006931.1	Hs00359840_m1
54	STK32B	NM_018401.1	Hs00179683_m1
55	TGFB3	NM_003239.1	Hs00234245_m1
56	TSPYL5	NM_033512.2	Hs00603217_s1
57	UCHL5	NM_015984.2	Hs00255374_m1
58	WISP1	NM_080838.1	Hs00365573_m1
59	ZNF533	NM_152520.3	Hs00332216_m1
60	SCUBE2	NM_020974.1	Hs00221277_m1

Así mismo, en la Tabla 12 se reflejan los genes analizados contenidos en el perfil desarrollado por Paik y cols. (191).

Tabla 12. Genes analizados extraídos del perfil publicado por Paik y cols.

Número de orden	Nombre del gen	GenBank / RefSeq	Número de identificación del ensayo
1	CCNB1	NM_031966.2	Hs00259126_m1
2	MKI67	NM_002417.3	Hs00606991_m1
3	MYBL2	NM_002466.2	Hs00231158_m1
4	AURKA	NM_003600.2	Hs00269212_m1
5	BIRC5	NM_001168.2	Hs00153353_m1
6	BCL2	NM_000633.2	Hs00608023_m1
7	ESR1	NM_000125.2	Hs00174860_m1
8	PGR	NM_000926.3	Hs00172183_m1
9	ERBB2	NM_004448.2	Hs00170433_m1
10	GRB7	NM_005310.2	Hs00180450_m1
11	CTSL2	NM_001333.2	Hs00952036_m1
12	MMP11	NM_005940.3	Hs00171829_m1
13	CD68	NM_001251.2	Hs00154355_m1
14	BAG1	NM_004323.4	Hs00185390_m1
15	SCUBE2 *	NM_020974.1	Hs00221277_m1

* SCUBE2: gen contenido también en el perfil de Van't Veer y cols., presente en ambos perfiles.

Por último, en la Tabla 13 se muestran los genes analizados extraídos del perfil estudiado por Ma y cols. (193,194).

Tabla 13. Genes analizados extraídos del perfil publicado por Ma y cols.

Número de orden	Nombre del gen	GenBank / RefSeq	Número de identificación del ensayo
1	HOXB13	NM_006361.5	Hs00197189_m1
2	IL17RB	NM_018725.3	Hs00218889_m1
3	CHDH	NM_018397.2	Hs00294875_m1

Así mismo, se incluyeron un total de 13 genes de referencia, también conocidos como “housekeeping”. Su expresión no varía significativamente de una persona a otra, por lo que permiten garantizar la existencia de una misma cantidad de ARNm en las distintas muestras estudiadas.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Con el objeto de seleccionar las muestras adecuadas para el estudio, se obtuvieron secciones para teñir con hematoxilina/eosina que fueron analizadas por un patólogo con experiencia. Se eligieron muestras que presentaran al menos un 70% de células tumorales.

3.1. Aislamiento del ARN.

Un total de 15 secciones de 5 µm de cada una de las muestras FFPE (*formalin-fixed paraffin embedded*) se desparafinaron mediante extracción con xileno, y a continuación se llevaron a cabo lavados con etanol en concentraciones decrecientes (100%, 90% y 70%). Posteriormente se extrajo el RNA mediante el kit Master Pure Purification (Epicentre).

3.2. Síntesis del ADN complementario.

Para poder llevar a cabo la reacción de amplificación es preciso sintetizar el ADNc correspondiente al ARN total aislado. En la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 µg hasta 10 µg de ARN en ADNc, en un volumen de 50 µL. En nuestro estudio decidimos abordar la síntesis de ADNc a partir 1 µg de ARN total de cada una de las muestras. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del kit, y empleando hexámeros al azar como cebadores. Se realizó en dos pasos, con las siguientes condiciones:

- 1º: 10 minutos a temperatura de 25°C
- 2º: 120 minutos a temperatura de 37°C

3.3. Reacción de RT-PCR cuantitativa.

La reacción de qRT-PCR consigue en las distintas muestras una amplificación de la cantidad de ADNc correspondiente a cada uno de los genes, obteniéndose durante la misma un incremento progresivo de la señal fluorescente, que permitirá la cuantificación del ADNc (como se explicó en la introducción).

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador *ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Como soporte se utilizaron las tarjetas microfluídicas (*Taqman Low Density Arrays*), también diseñadas por Applied Biosystems. Cada uno de los puertos de la tarjeta contenía 50 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* y 50 µL del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 100 ng del ARN total, que fue la misma para todas las muestras).

3.4. Medición de la expresión génica.

Se obtuvieron los valores medios de ciclo umbral (Ct, de sus siglas en inglés, Threshold Cycle), definido como el punto a partir del cual la fluorescencia es claramente distinguible de la fluorescencia basal, mediante el software SDS 2.2 (Applied Biosystems) (173). El valor umbral máximo de Ct se fijó en 40 ciclos. Los métodos originalmente descritos para cada uno de los perfiles fueron utilizados para analizar su comportamiento.

3.5. Cálculos realizados para cada perfil génico.

- Perfil holandés de 70 genes (Van't Veer y cols): se utilizaron 60 de los 70 genes del estudio original. Trabajos anteriores han demostrado que una reducción en el número de genes tenía poco impacto en el comportamiento del clasificador (169,209,210). El nivel de expresión relativa de cada gen diana se expresó como $\Delta Ct = NF - Ct_{gen}$ (NF: Factor de Normalización). La normalización se llevó a cabo calculando la media geométrica del mejor grupo de genes housekeeping (IPO8, POLR2A, UBC y SDHA). Dado que el perfil de 70 genes fue definido utilizando microarrays, los valores de Ct normalizados fueron z-transformados (es decir, que a cada valor del Ct se le resta la media de dicho gen en toda la serie y se divide por la desviación estándar de dicho gen en toda la serie). Se calculó el perfil medio de mal pronóstico determinando el valor medio de expresión para cada gen en la serie de pacientes que habían recaído. Después se calculó el coeficiente de correlación entre este perfil medio de mal pronóstico y el perfil de expresión de cada paciente. El punto de corte fue un valor = 0, como también ha sido descrito en trabajos previos (209).

- Perfil de Paik y cols (Índice de recaída): la expresión de cada gen fue normalizada en relación con la expresión de los genes de referencia (ACTB, GAPDH, GUS, RPLP0 y TFRC). Estos datos de expresión génica fueron calculados como se describe en el trabajo original, es decir, un incremento de una unidad en los niveles de medición de la expresión génica se corresponde aproximadamente con un incremento de dos veces en la cantidad de ARN. Se substituyó GSTM1 por GSTM3, ya que no existe ningún kit para la determinación de GSTM1, y tal y como se describió por los autores en la patente (Baker J et al, <http://www.freepatentsonline.com/20050048542.html>). El algoritmo de este perfil fue empleado para generar una estimación del riesgo de recaída o RS (Recurrence Score) para cada paciente. Los valores fueron escalados y se encuadró a cada paciente en el grupo de riesgo bajo, intermedio o alto de recaída, usando los valores de corte para el RS descritos previamente (191).

- Perfil de Ma y cols (perfil de 2 genes): los niveles de expresión de HOXB13 e IL17RB se expresaron como $\Delta Ct = NF - Ct_{\text{gen}}$. Para obtener el valor de NF, se obtuvo la media de los valores de Ct de los genes de referencia (ACTB, HMBS, SDHA y UBC). Los valores para cada gen fueron z-transformados, y se calculó el riesgo de recaída para cada caso usando un punto de corte de 1 en la diferencia entre ambos genes, como ya se ha descrito (193).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para evaluar el valor pronóstico de cada modelo basado en expresión génica se llevó a cabo un análisis de Kaplan-Meier univariante mediante el test del rango (también llamado test de Cox-Mantel, o log-rank test). Así mismo, se llevó a cabo un análisis multivariante de Cox de riesgos proporcionales para cada perfil, incluyendo grado tumoral (grado 1 vs 2, grado 1 vs 3), tamaño tumoral (≤ 2 cm vs >2 cm) y afectación

ganglionar (sin afectación vs afectación de 1-3 ganglios). El objetivo principal fue el tiempo hasta la aparición de metástasis. Se seleccionó este parámetro porque predice fielmente el riesgo de muerte entre las pacientes que recaen, es decir, el tiempo hasta la aparición de metástasis se correlaciona con la supervivencia global de las pacientes pero los resultados están disponibles con un menor tiempo de seguimiento.

Para evaluar la solidez de la asociación entre los diferentes perfiles, se realizó también un análisis mediante el cálculo de la V de Cramer y un análisis de contingencia en tablas dos a dos.

Para medir la capacidad discriminatoria del modelo a cinco años se calculó el índice de concordancia de Harrell. El índice de concordancia es el porcentaje de casos en los que lo predicho por el test y lo que sucede en la realidad coinciden; un valor de 0.50 representa la concordancia debida a la casualidad, mientras que un valor de 1.0 representa la discriminación perfecta.

Por otro lado, para identificar si los datos obtenidos mediante el estudio de perfiles génicos son superiores a los factores clínicos clásicos, los parámetros clínicos de cada paciente fueron analizados mediante el software Adjuvant!TM (92), obteniéndose para cada caso el riesgo de recaída y el beneficio esperable del tratamiento quimioterápico y hormonal.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el software SPSS v9.1 y GraphPad Prism v5.0.

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Las características clínicas y anatomopatológicas de las 153 pacientes incluidas en el estudio se describen en la Tabla 14. La mediana de edad fue de 58 años (rango: 29-82). Un total de 96 pacientes (62.7%) no tenían afectación ganglionar axilar, mientras que 57 pacientes (37.3%) sí la presentaban. Cincuenta y nueve pacientes (38.6%) tenían tumores pobremente diferenciados. No se incluyeron pacientes T3, N2 ni receptores hormonales negativos, como se refleja previamente en los criterios de inclusión del estudio.

Del total de 153 pacientes, 56 casos (36.6%) no recibieron quimioterapia, 42 casos (27.4%) recibieron esquemas de quimioterapia que no contienen antraciclinas (fundamentalmente CMF), y 55 casos (35.9%) recibieron quimioterapia que incluye antraciclinas (esquemas tipo FEC o EC). Dado que los tumores tenían receptores hormonales positivos, todas las pacientes recibieron tamoxifén.

Con una mediana de seguimiento de 92 meses, el 22% de las pacientes, es decir, un total de 34, presentaron una recaída a distancia, con resultado de muerte en 17 de los casos, mientras que se perdió el seguimiento de 7 pacientes tras la recaída. Un total de 4 pacientes tuvieron una recaída local que pudo ser tratada eficazmente mediante cirugía.

Tabla 14. Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas.

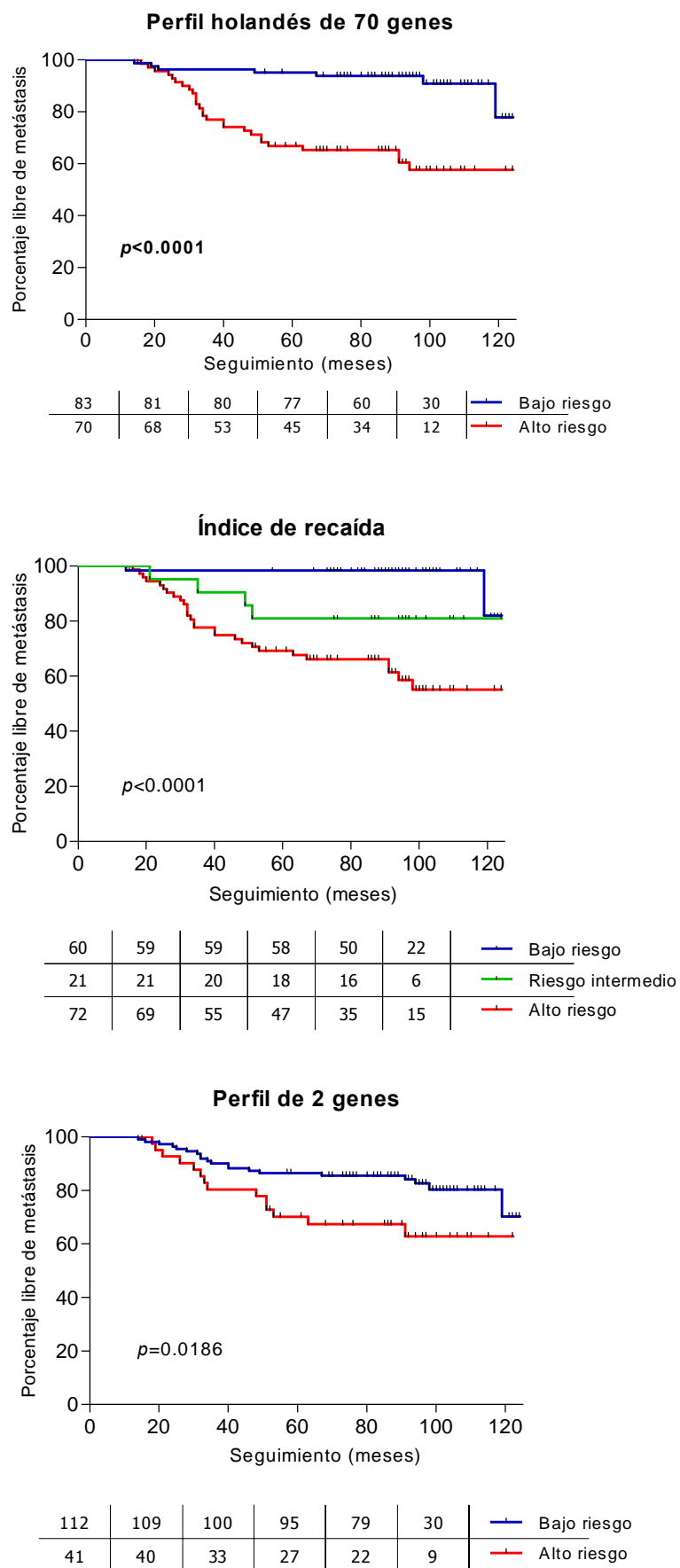
	Número de pacientes (porcentaje)
Edad	Mediana: 58 (Rango: 29-82)
T	
1	77 (50.3%)
2	76 (49.7%)
3	0 (0%)
x	0 (0%)
N	
0	96 (62.7%)
1	57 (37.3%)
Estadio	
I	61 (39.9%)
IIa	51 (33.3%)
IIb	41 (26.8%)
Receptores hormonales	
RE+/RP-	30 (19.6%)
RE+/RP+	110 (71.9%)
RE+/RP desconocido	12 (7.9%)
RE-/RP+	1 (0.7%)
RE-/RP-	0 (0%)
Grado	
1	29 (18.9%)
2	64 (41.8%)
3	59 (38.6%)
x	1 (0.7%)
Quimioterapia	
Sin quimioterapia	56 (36.6%)
Quimioterapia sin antraciclinas	42 (27.4%)
Quimioterapia con antraciclinas	55 (35.9%)
Hormonoterapia	153 (100%)

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA POBLACIÓN GLOBAL.

Todos los genes incluidos en el estudio pudieron ser correctamente analizados mediante qRT-PCR, a partir de muestras parafinadas. Para cada uno de los perfiles génicos se calculó la supervivencia libre de enfermedad a distancia, encuadrando a las pacientes en el grupo de riesgo que les correspondería según cada perfil.

Los resultados obtenidos para cada perfil se reflejan en la figura 6. Para el perfil holandés de 70 genes de van't Veer y cols. se observa una supervivencia libre de metástasis (SLM) a 5 años de un 95% en las pacientes incluidas en el grupo de bajo riesgo frente a un 66% en las pacientes de alto riesgo. Para el perfil de Paik y cols. (Índice de recaída) la SLM a 5 años fue de un 98% para las pacientes de bajo riesgo frente a un 81% para los casos de riesgo intermedio, y frente a un 69% para los casos de alto riesgo. Por último, para el perfil de Ma y cols. (perfil de 2 genes) la SLM resultó ser de un 86% para las pacientes con un perfil de bajo riesgo, y de un 70% para los casos con un perfil de alto riesgo.

Figura 6. Análisis de SLM a 5 años para cada uno de los perfiles.



En el análisis univariante de las variables con valor pronóstico, resultaron tener un valor estadísticamente significativo la afectación ganglionar, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación y los tres perfiles génicos analizados, como se refleja en la Tabla 15.

Tabla 15. Variables con valor pronóstico estadísticamente significativo en el análisis univariante.

Afectación ganglionar	p=0.001
Tamaño tumoral	p<0.001
Grado de diferenciación	p=0.002
Perfil holandés de 70 genes	p<0.001
Índice de recaída	p<0.001
Perfil de 2 genes	p=0.023

Se realizó un análisis multivariante de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el valor pronóstico de cada uno de los perfiles por separado, incluyendo el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y el grado de diferenciación. Como se puede ver en los resultados reflejados en la Tabla 16 (HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%), tanto el perfil holandés de 70 genes como el Índice de recaída resultaron estadísticamente significativos a la hora de predecir el pronóstico de las pacientes, mientras que el perfil de 2 genes no alcanzó dicha significación en este análisis multivariante. Estos datos respecto al perfil de 2 genes son, en cierto modo, concordantes con los obtenidos en el análisis univariante, en el cual se observaba que, de los tres perfiles génicos analizados, el perfil de 2 genes es el que tiene un valor de “p” más próximo a la no significación estadística. De los factores clínicos clásicos, solo la afectación ganglionar permaneció como estadísticamente significativa para los análisis realizados en cada uno de los tres perfiles génicos.

Tabla 16. Resultados del análisis multivariante.

	Perfil holandés de 70 genes		
	HR	IC 95%	Valor de p
Tamaño tumoral (<2cm vs >2cm)	1.398	0.571 – 3.424	1.398
Ganglios (0 vs 1-3)	2.706	1.303 – 5.622	0.008
Grado de diferenciación (1 vs 2) (1 vs 3)	0.819	0.160 – 4.181	0.113
	2.349	0.473 – 11.672	0.810 0.297
Perfil de 70 genes	3.506	1.331 – 9.229	0.011
	Índice de recaída		
	HR	IC 95%	Valor de p
Tamaño tumoral (<2cm vs >2cm)	1.172	0.487 – 2.822	0.724
Ganglios (0 vs 1-3)	2.497	1.207 – 5.168	0.014
Grado de diferenciación (1 vs 2) (1 vs 3)	0.682	0.135 – 3.453	0.043
	2.267	0.494 – 10.404	0.644 0.292
Índice de recaída (Riesgo bajo vs intermedio) (Riesgo bajo vs alto)	4.466	0.787 – 25.331	0.021
	8.180	1.767 – 37.861	0.091 0.007
	Perfil de 2 genes		
	HR	IC 95%	Valor de p
Tamaño tumoral (<2cm vs >2cm)	1.597	0.674 – 3.782	0.287
Ganglios (0 vs 1-3)	2.314	1.132 – 4.729	0.021
Grado de diferenciación (1 vs 2) (1 vs 3)	1.076	0.216 – 5.637	0.002
	4.932	1.111 – 21.903	0.929 0.036
Perfil de 2 genes	1.181	0.579 – 2.410	0.647
	Factores clínicos clásicos		
	HR	IC 95%	Valor de p
Tamaño tumoral (<2cm vs >2cm)	1.613	0.683 – 3.811	0.276
Ganglios (0 vs 1-3)	2.334	1.145 – 4.757	0.020
Grado de diferenciación (1 vs 2) (1 vs 3)	1.074	0.215 – 5.359	0.001
	5.139	1.168 – 22.612	0.931 0.030

Para calcular la concordancia entre cada uno de los perfiles a la hora de asignar cada caso individual a una u otra categoría de riesgo de recaída, se calculó el estadístico conocido como V de Cramer. Se compara el porcentaje de casos coincidentes al aplicar un perfil en relación con lo estimado por los otros dos perfiles. Para realizar este análisis, los casos encuadrados en el grupo de riesgo bajo e intermedio mediante el Índice de recaída se agruparon en una misma categoría de bajo riesgo de recaída. El resultado se refleja en la Tabla 17.

Tabla 17. Concordancia entre los tres perfiles analizados (V de Cramer).

BAJO RIESGO DE RECAÍDA	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA	
Perfil holandés de 70 genes	79% Índ.recaída	85% Perfil de 2 genes
Índice de recaída	81% Perfil holandés	84% Perfil de 2 genes
Perfil de 2 genes	63% Perfil holandés	61% Índ.recaída
ALTO RIESGO DE RECAÍDA	PORCENTAJE DE COINCIDENCIA	
Perfil holandés de 70 genes	78% Índ.recaída	58% Perfil de 2 genes
Índice de recaída	76% Perfil holandés	39% Perfil de 2 genes
Perfil de 2 genes	71% Perfil holandés	69% Índ.recaída

Dentro del grupo de bajo riesgo de recaída, es decir, de buen pronóstico, se observa que, aunque la concordancia es aceptable entre los tres perfiles, es bastante mayor entre el perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída, mientras que la concordancia de éstos con el perfil de 2 genes es algo menor. En el grupo de alto riesgo de recaída, se mantiene una buena concordancia entre el perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída, mientras que la concordancia con el perfil de 2 genes, en este grupo de pacientes, es claramente menor.

Por otro lado, para evaluar la capacidad discriminativa de cada uno de los perfiles, se llevó a cabo el cálculo del índice de Harrell. Este índice es el porcentaje de casos en los que lo predicho por el test y lo observado en la realidad coinciden. Este índice alcanzó un valor de 0.73 para el Índice de recaída, mientras que el valor para el perfil holandés de 70 genes fue de 0.70, y el valor para el perfil de 2 genes, 0.59. Por lo tanto, el perfil con una mayor precisión fue el Índice de recaída, aunque resultó muy similar a la del perfil holandés de 70 genes.

Así mismo, se utilizó el software Adjuvant!TM para estimar el beneficio de iniciar un tratamiento quimioterápico en cada caso concreto. Se estableció un valor límite de 5%

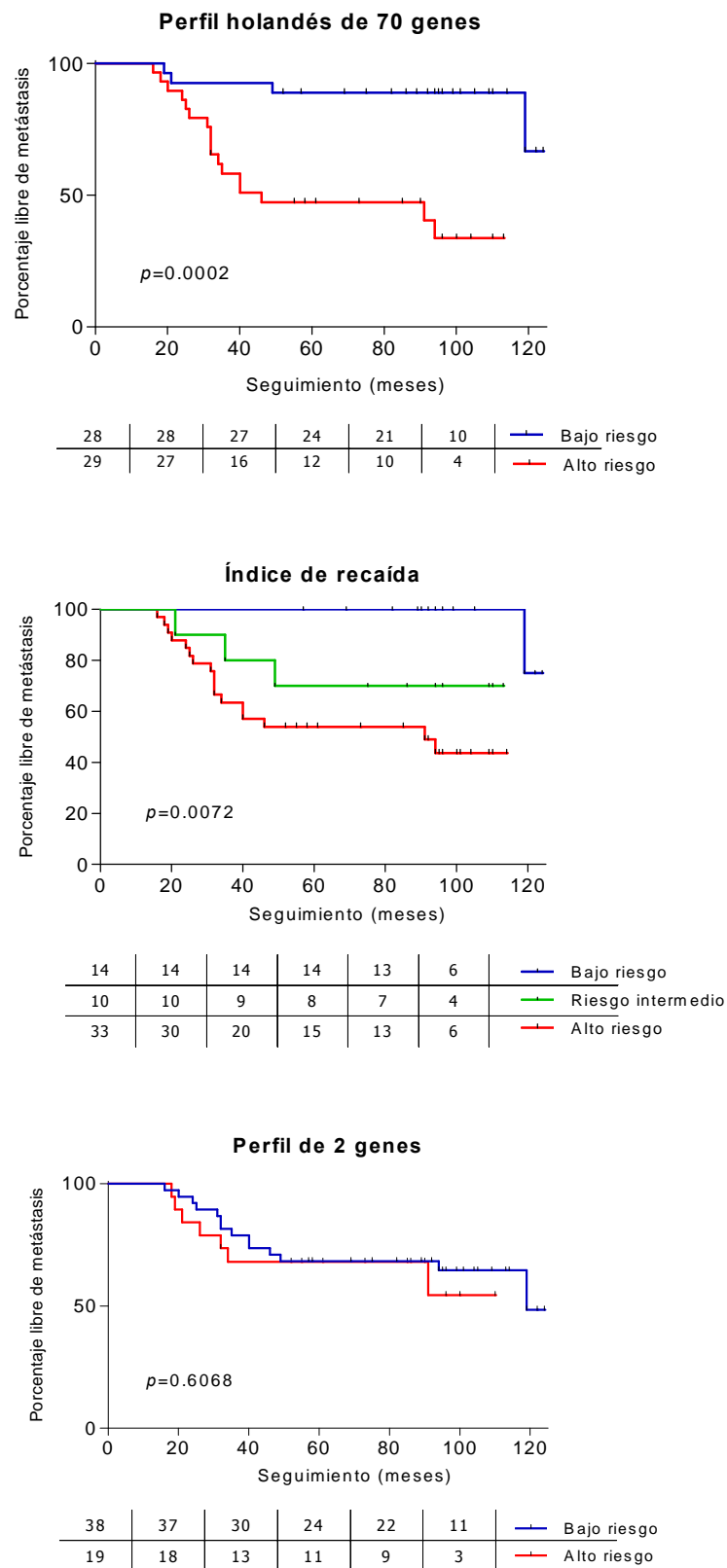
en beneficio (reducción del riesgo de recaída) atribuible a la quimioterapia para considerar que en ese caso la paciente recibiría dicho tratamiento. Aplicando Adjuvant!TM únicamente un 37% de los casos obtienen un beneficio menor a este 5% y, por tanto, no serían candidatos a priori a recibir un tratamiento quimioterápico. Aplicando los tres perfiles génicos, quedan más pacientes en el perfil de bajo riesgo: concretamente, un 47% según el perfil holandés de 70 genes, un 53% según el Índice de recaída (sumando los casos en riesgo bajo e intermedio) y un 73% según el perfil de 2 genes. Esto supone que, al menos en teoría, se estaría eliminando cierto porcentaje de sobretratamiento en nuestras pacientes al aplicar los perfiles génicos en comparación con el Adjuvant!TM, que evalúa factores clínicos y moleculares “clásicos”.

3. ANÁLISIS EN EL SUBGRUPO CON AFECTACIÓN GANGLIONAR.

En este subgrupo quedan englobados un total de 57 pacientes. Realizado el análisis de SLM a 5 años en este grupo se observa que, mientras se mantienen las diferencias mediante el perfil holandés de 70 genes y mediante el Índice de recaída entre distintos grupos de riesgo, no sucede lo mismo con el perfil de 2 genes (Figura 7).

Concretamente, para el perfil holandés de 70 genes, se observa una SLM a 5 años de un 85% para el grupo de bajo riesgo, frente a un 41% para el grupo de alto riesgo ($p=0.0002$). Para el Índice de recaída, se obtiene una SLM a 5 años de un 100% para el grupo de bajo riesgo, 80% para el de riesgo intermedio y 45% para el de alto riesgo ($p=0.0072$). Sin embargo para el perfil de 2 genes, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (63% vs 58%, $p=0.6068$).

No se realizaron análisis para otros subgrupos, como por ejemplo pacientes que recibieron o no tratamiento quimioterápico, o en relación con el grado histológico.

Figura 7. Análisis de la SLM a 5 años en los casos con afectación ganglionar.

Discusión

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que agrupa pacientes con pronósticos muy diferenciados desde el momento de su diagnóstico. Actualmente, se emplean factores clínicos, tales como el tamaño del tumor en la mama o la presencia de afectación ganglionar, para decidir el tratamiento complementario a la cirugía, pero la utilidad de estos factores es limitada. En los últimos años se han analizado perfiles de expresión génica en cáncer de mama que puedan contribuir a determinar de una manera más precisa el riesgo de recaída, y por lo tanto ayuden a escoger mejor a las pacientes subsidiarias de un tratamiento quimioterápico adyuvante.

En este trabajo hemos analizado el funcionamiento de los tres principales perfiles génicos publicados, a partir de muestras conservadas en parafina, en una muestra independiente de pacientes, y empleando únicamente “*kits*” comerciales para el análisis génico. Se ha demostrado que estos tres perfiles mantienen su valor pronóstico empleando muestras conservadas en parafina, algo de particular importancia en el caso del perfil holandés de 70 genes, ya que éste ha obtenido sus resultados a partir de muestras congeladas, aspecto que se comentará en mayor profundidad más adelante.

Por otro lado, también se ha comprobado que, comparativamente, de estos tres perfiles, los que ofrecen un mejor rendimiento son el perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída, mientras que los resultados del perfil de 2 genes, al menos en nuestro grupo de pacientes, son algo más pobres, sobre todo en los casos que presentaban afectación ganglionar.

Así mismo, este trabajo supone la validación de los resultados obtenidos por los perfiles en una muestra independiente y con una tecnología alternativa, lo que confirma el potencial valor pronóstico de estos perfiles génicos en pacientes con cáncer de mama precoz.

Inicialmente, se analizarán los perfiles génicos estudiados; seguidamente, se discutirán los resultados obtenidos, y por último, se expondrá la situación actual y las futuras líneas de investigación abiertas en este campo.

1. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS.

1.1. Perfiles de genes analizados.

A la hora de diseñar este trabajo, se decidió llevar a cabo el análisis de los tres perfiles génicos que, de una forma más consistente, habían sido publicados con potencial valor pronóstico en cáncer de mama localizado.

a) Perfil holandés de 70 genes.

El trabajo original fue publicado por van't Veer y cols. en el año 2002 (183), y ha sido posteriormente validado en otras muestras (184-187), aunque siempre empleando tejido congelado. Este perfil, conocido actualmente como *MammaPrint*, está comercializado y disponible para su uso en la clínica, aunque no se emplea de forma habitual.

En este trabajo, se analizaron 60 de estos 70 “genes” (hay que recordar que no se trata estrictamente de genes, sino de secuencias de oligonucleótidos), ya que de los otros 10 genes no existía “*kit*” comercial disponible para su análisis. Como ya ha sido mencionado en el apartado de “Material y Métodos”, existe evidencia que apoya que una reducción en el número de genes no afecta sustancialmente al rendimiento de este perfil. En uno de estos trabajos, Bair y cols. proponen un método estadístico alternativo para análisis de múltiples genes al cual denominan análisis semi-supervisado, y con el que re-analizaron los datos de expresión génica del estudio holandés, estableciendo un perfil de tan solo 5 genes que era predictivo de metástasis (169). Glinsky y cols. correlacionaron la expresión del perfil de 70 genes en líneas celulares con los datos

obtenidos de las muestras tumorales de las pacientes de la serie holandesa, y, posteriormente, mediante la utilización de datos cuantitativos de expresión por qRT-PCR, establecieron varios perfiles con un número reducido de genes (14, 13, 6 y 4 genes) que distinguían grupos de pacientes con distinto pronóstico (210).

Por otro lado, para evaluar el rendimiento de la técnica de qRT-PCR empleando muestras parafinadas en comparación con muestras congeladas, hemos realizado un estudio preliminar en 30 casos en los que se disponía de ambas muestras (en fresco y conservadas en parafina), observándose una elevada correlación en la expresión génica entre ambas, y sin que se evidenciara un importante deterioro o degradación del tejido secundario a la conservación en parafina. Estos resultados son consistentes así mismo con los resultados finales de este trabajo, pues se comprueba que el perfil holandés de 70 genes mantiene su valor pronóstico aunque los análisis se realicen a partir de muestras conservadas en parafina y no a partir de tejido fresco congelado, como en el estudio original.

b) Índice de recaída (perfil de Paik).

El estudio original fue publicado en el año 2004 (191), obteniéndose un perfil génico con capacidad pronóstica compuesto por 21 genes a partir de una muestra de pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar y con receptores hormonales positivos, que habían recibido tratamiento con tamoxifeno. En este caso, se emplearon muestras conservadas en parafina, y se analizaron mediante qRT-PCR, de la misma manera que se ha hecho en nuestro estudio. Al contrario que en los otros dos perfiles analizados en nuestro trabajo, el Índice de recaída divide a las pacientes en tres grupos de riesgo de recaída (bajo, intermedio y alto), mientras que los otros dos perfiles sólo establecen dos categorías de riesgo.

Este perfil, comercializado bajo el nombre de *OncotypeDX*, también ha comenzado a emplearse en la clínica, sobre todo en los Estados Unidos, pero su uso en la práctica habitual en nuestro país es excepcional. Ha sido validado posteriormente en otros estudios (192), pero con una particularidad, puesto que en todos los trabajos de validación las muestras eran remitidas al mismo laboratorio que realizó el trabajo original, siendo éste el que calculaba el Índice de recaída para cada caso. Por lo tanto, nuestro trabajo supone la primera validación realmente independiente de este perfil génico, pues los cálculos del Índice de recaída se han realizado en nuestro centro empleando los algoritmos del trabajo original

c) Perfil de 2 genes (perfil de Ma).

Fue publicado en el año 2004 (193), y establece el riesgo de recaída de pacientes con cáncer de mama precoz en relación a la expresión de 2 genes, IL17BR y HOXB13. El estudio inicial se realizó sobre 60 pacientes, pero posteriormente se publicó una validación sobre una muestra mucho más amplia de 852 casos (194), así como otras validaciones posteriores (195,196). En este último año, este grupo ha publicado un trabajo en el que complementa su perfil de 2 genes con otros 5 genes relacionados con el grado molecular, y con el que parece mejorar el rendimiento del perfil (211). Actualmente, también se encuentra en proceso de comercialización, aunque de un modo menos avanzado que los otros dos perfiles estudiados en este trabajo.

1.2. Procesamiento y análisis de los perfiles génicos.

En los estudios de expresión génica, y, concretamente, cuando se emplea la qRT-PCR resulta imprescindible realizar adecuados controles de calidad debido a la labilidad del ARN. En nuestro trabajo se llevaron a cabo dos controles de calidad, uno con la determinación de la concentración y pureza del ARN por espectrofotometría, y otro

mediante electroforesis nativa en geles de agarosa, que garantizaron el estado adecuado del ARN.

Además de estos controles, posteriormente siempre se debe realizar una normalización cuidadosa para poder comparar los distintos niveles de expresión de cada ARNm, ya que la variabilidad en los protocolos utilizados para el aislamiento del ARN y el paso a ADNc puede producir falsas diferencias de expresión (212). Para ello, habitualmente, se selecciona un gen (o varios) de referencia, cuya expresión se mantiene constante en todas las muestras, para obtener la garantía de que las diferencias de expresión entre las distintas muestras no se deben a errores en su procesamiento. Se han descrito distintos genes de referencia, pero no existe un consenso sobre cuál es el más adecuado, ya que las características de cada técnica y de cada tipo de muestra pueden condicionar la fiabilidad de cada uno de ellos. Por otro lado, cada vez existen más datos de que ningún ARNm mantiene una expresión constante, y se ha observado que los niveles de expresión de los ARNm de algunos genes considerados de referencia, como el GAPDH, pueden variar en ciertas condiciones experimentales y en relación a su activación para sus diversas funciones celulares (213). En nuestro estudio, se incluyeron un total de 13 genes de referencia, también conocidos como “*housekeeping*”, seleccionados de entre los empleados de forma más habitual en este tipo de trabajos. Así mismo, se empleó un método propio de normalización desarrollado a partir de otros métodos empleados con anterioridad en este tipo de estudios (GeNorm, NormFinder) (214), que se ha denominado “modelo de integración”, y que consigue corregir las diferencias tanto en calidad como en cantidad del ARNm.

1.3. Técnica de qRT-PCR.

La mayor parte de los principales estudios de múltiples genes publicados se han realizado con *microarrays* (179,183,188,200-202). Los *microarrays* son una excelente

herramienta para el estudio inicial de un gran número de genes (en la actualidad pueden llegar a analizar el genoma completo), pero, como ya se ha comentado, los resultados de cualquier estudio siempre deben ser validados en otras series de enfermos y a ser posible con una tecnología alternativa (215). Uno de los principales inconvenientes de los *microarrays* es la existencia de una variabilidad en los resultados, que puede depender de varios factores: la plataforma utilizada, el protocolo de procesamiento de las muestras, el investigador o el laboratorio (216). Por otro lado, los *microarrays* proporcionan una cantidad ingente de datos, que deben ser procesados por personal experimentado. En los estudios publicados hasta la fecha se han utilizado diversos métodos estadísticos para clasificar a los enfermos en función de los perfiles de expresión de genes, sin que exista actualmente un consenso sobre cuál es el método más preciso y adecuado (217).

El estudio de expresión génica mediante la utilización de qRT-PCR en tarjetas microfluídicas ha supuesto un importante avance tecnológico, ya que posibilita el análisis simultáneo de un número importante de genes, y permite que esta técnica pueda ser una alternativa a los *microarrays*, con una serie de ventajas respecto a ellos. En primer lugar, la qRT-PCR proporciona resultados cuantitativos, precisos y fácilmente reproducibles. Además, requiere una menor cantidad de tejido tumoral para realizar el análisis, y no es indispensable que el tejido sea obtenido en fresco, puesto que estudios recientemente realizados han demostrado que, mediante qRT-PCR, es posible determinar la expresión génica a partir de bloques conservados en parafina (191,193).

Por tanto, los *microarrays* tienen un papel fundamental en el análisis inicial de miles de genes para seleccionar los implicados en el pronóstico o la respuesta a fármacos, pero, por las ventajas descritas, la qRT-PCR sería la técnica más adecuada para los estudios

de validación de un número limitado de genes así como para una posible utilización en la clínica en el futuro.

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

2.1. Características clínico-patológicas de las pacientes: comparación con la población analizada en los tres perfiles génicos.

Nuestra muestra incluye mujeres diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante de mama, estadios I-II, con receptores hormonales positivos y que han recibido un tratamiento adecuado para la enfermedad neoplásica.

Si comparamos nuestra población con la analizada en el perfil holandés de 70 genes, existen algunas diferencias importantes. El perfil original fue validado por Van de Vijver y cols. en un grupo de enfermas menores de 52 años, y, dado que la edad es un factor pronóstico reconocido en el cáncer de mama, podría haber condicionado las características del perfil. En nuestro estudio el rango de edad osciló entre 29 y 82 años, con una mediana de 58 años, que coincide con la mediana de edad de diagnóstico del cáncer de mama en la población general.

También existen diferencias importantes en lo referente al tratamiento adyuvante administrado. Mientras que en el estudio holandés únicamente un 3% de las pacientes sin afectación ganglionar recibieron quimioterapia, en nuestro trabajo lo hicieron un 48% de los casos. Así mismo, en el estudio holandés, de entre todas las pacientes con receptores hormonales positivos, sólo un 17% recibieron hormonoterapia adyuvante, mientras que en nuestra población lo recibieron todas las pacientes, ya que esto se consideraba un requisito para ser seleccionable y entrar en el análisis. Por lo tanto, parece evidente que las pacientes del estudio holandés recibieron un tratamiento subóptimo. Aunque las pacientes incluidas en nuestro estudio presentaban algunos

factores de mal pronóstico (el 37% tenían los ganglios afectados y el 49,7% tumores mayores de 2 cm), la SLM y SG fueron excelentes. La tasa de recaídas a distancia de nuestra serie fue tan sólo del 22%, frente al 40% del estudio holandés. Esta diferencia podría explicarse porque la mayoría de las pacientes del trabajo holandés recibieron un tratamiento adyuvante insuficiente de acuerdo al estándar actual, como se ha comentado previamente. Los resultados favorables de la evolución de las enfermas de nuestro estudio teóricamente disminuirían las posibilidades de validar un marcador pronóstico, a no ser que éste fuese muy potente.

En comparación con el estudio que desarrolló el Índice de recaída, aunque hay bastantes similitudes, sobre todo en cuanto a la técnica empleada, también existen diferencias. En este estudio se incluyeron únicamente pacientes sin afectación ganglionar, que hubieran recibido tamoxifén como tratamiento adyuvante. Estas pacientes se extrajeron de un ensayo previo, el NSABP-B14, que analizaba el papel del tamoxifén adyuvante en pacientes con cáncer de mama operado con receptores estrogénicos positivos, y sin afectación ganglionar axilar (21). La primera diferencia evidente es que en nuestra población se incluyen pacientes con afectación axilar, lo que confiere un peor pronóstico al grupo. Así mismo, la proporción de tumores mayores de 2 cm también es mayor en nuestro grupo (49,7% frente a 33% en el ensayo de Paik y cols.). Sin embargo, a pesar de ese peor pronóstico “a priori” en nuestro grupo, los datos de SLM y SG siguen siendo buenos, con un 22% de recaídas a distancia en nuestra serie y un 15% en el trabajo de Paik y cols. Probablemente, la presencia de pacientes con mayor carga tumoral en nuestro trabajo se haya equilibrado con el empleo de tratamiento quimioterápico, que no se utilizó en las pacientes del estudio de Paik.

Por último, en relación con el perfil de 2 genes, las diferencias también son evidentes. Para el desarrollo de este perfil, sobre todo en el estudio de validación (194), se

incluyeron pacientes con características muy heterogéneas: pacientes con afectación ganglionar importante (N2 – más de 4 ganglios afectados en un 24% de los casos), tamaño superior a 5 cm de la lesión en mama (9% de los casos) e inclusión de pacientes con receptores estrogénicos negativos (hasta un 10% del total). Por otro lado, hasta un 66% de los casos no recibieron tratamiento con tamoxifén a pesar de expresar receptores hormonales. Todo esto conllevó que, en el análisis por subgrupos, el perfil sólo demostrara capacidad pronóstica en el grupo sin afectación ganglionar y con expresión de receptores hormonales, y que hubieran sido tratadas con tamoxifén. Aparte, no queda claro si el perfil es puramente pronóstico o predictivo de respuesta a tamoxifén. Nuestra muestra, en este sentido, es claramente más homogénea, lo que hace más asequible teóricamente extrapolar los resultados obtenidos a la práctica clínica.

2.2. Capacidad predictiva de cada uno de los perfiles génicos.

Las curvas de SLM calculadas mediante el método de Kaplan-Meier en nuestra población, para cada uno de los perfiles, demuestran que en los tres casos se separan grupos pronósticos con un riesgo de recaída diferenciado. Esta diferencia es estadísticamente significativa para los tres perfiles génicos en la muestra global de nuestro estudio. Estos datos se confirman en el análisis univariante de las variables con valor pronóstico, en el que, además de los tres perfiles, demuestran dicho valor el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y el grado tumoral.

Sin embargo, en el análisis multivariante, únicamente el perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída muestran una significación estadística a la hora de estimar la SLM en la población global. Esto no implica necesariamente que el perfil de 2 genes no aporte información pronóstica, sino que, al menos en nuestra población, su capacidad para estimar el riesgo de recaída es menor que la de los otros dos perfiles analizados.

Como ya se ha comentado previamente, se calculó el nivel de concordancia entre los tres perfiles analizados y se observó que esta concordancia era mayor entre el perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída. Este dato también apoya que estos dos perfiles son más robustos, y su estimación del riesgo más consistente entre sí, mientras que la concordancia de ambos con el perfil de 2 genes resultó ser menor.

Así mismo, para evaluar la precisión de cada uno de estos perfiles, también se calculó el denominado índice de Harrell, que consiste en comprobar el porcentaje de casos en que lo predicho por el test y lo observado en la realidad coincide. Un valor de 0.5 supondría una coincidencia por azar, mientras que un valor de 1 supondría una correlación perfecta. Nuevamente, los datos son coherentes: el perfil con un índice más elevado es el Índice de recaída (0.73), aunque con un valor muy similar al del perfil holandés (0.70), mientras que el perfil de 2 genes resultó ser menos preciso (0.59).

Por último, y aunque los análisis por subgrupos en estudios con un tamaño muestral limitado deben ser interpretados con cautela, esta diferencia sigue observándose en los casos con afectación ganglionar; en estos casos, tanto el perfil holandés de 70 genes como el Índice de recaída siguen separando dos grupos con un riesgo de recaída diferente, mientras que el perfil de 2 genes no lo logra.

Por lo tanto, según los resultados de nuestro estudio, tanto el perfil holandés de 70 genes como el Índice de recaída muestran una capacidad superior a la hora de predecir el riesgo de recaída. Esta capacidad, por otro lado, es independiente de la plataforma con la que se realiza el análisis de expresión génica y del material a partir del cual se extrae el ARNm, lo que indica que el valor de cada uno de estos perfiles no está tanto en el procesamiento o en el análisis de las muestras como en los propios genes seleccionados en cada perfil.

También se analizó si la capacidad pronóstica de estos perfiles génicos era superior a la que se obtiene con los factores clínicos que se emplean habitualmente en la práctica clínica diaria. Para ello, se utilizó el software AdjuvantTM (92), que calcula el beneficio estimado de un tratamiento complementario (ya sea quimioterapia u hormonoterapia) en función de estos factores: edad, patología concomitante, expresión de receptores hormonales, tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado tumoral y tipo concreto de hormonoterapia o quimioterapia que se aplicaría en cada caso. Se estima que si el beneficio atribuible a la quimioterapia es menor de un 5%, en general no se recomienda el empleo de quimioterapia adyuvante. Se realizó el cálculo de este beneficio para las 153 pacientes del estudio, obteniéndose un 63% de pacientes en los que se recomendaría su aplicación, frente a un 37% en los que se consideraría que la quimioterapia no supone un beneficio significativo. Si comparamos estos resultados con los obtenidos con cada uno de los perfiles, hallamos que, según el perfil holandés de 70 genes, hasta un 47% de los casos quedarían encuadrados en el grupo de bajo riesgo y, teóricamente, no serían subsidiarios de tratamiento quimioterápico. Para el Índice de recaída, un 53% de los casos (sumando los de riesgo bajo e intermedio) no recibirían quimioterapia, y este porcentaje sube hasta un 73% en el caso del perfil de 2 genes. Esto quiere decir que, si se comprueba el valor pronóstico de estos perfiles en estudios prospectivos, se estaría eliminando cierto porcentaje de “sobretratamiento”, ya que un porcentaje considerable de las pacientes que reciben quimioterapia realmente no se benefician de ella, pero sí quedan expuestas a su potencial toxicidad.

3. EL FUTURO DE LOS PERFILES GÉNICOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

Nuestro trabajo representa una validación de los resultados obtenidos por los tres perfiles génicos estudiados en una población independiente y con una tecnología

alternativa, lo que añade evidencia al hecho de que estos perfiles tienen una capacidad para predecir el pronóstico de las pacientes operadas de cáncer de mama precoz. Sin embargo, para que alguno de estos perfiles se incorpore a la práctica clínica diaria, antes debe existir una evidencia más sólida de que este valor pronóstico existe, y de que es superior al pronóstico estimado por los factores clínicos clásicos.

Una limitación de todo este tipo de estudios es que, comparativamente, el tamaño muestral es relativamente pequeño en relación con el número de genes que se analizan. Un pequeño tamaño muestral podría ocultar la identificación de algunos genes con una implicación en el pronóstico (218). Por otro lado, cualquier estudio que establezca un nuevo perfil de genes asociado al pronóstico requiere una validación, pero en los trabajos comunicados hasta la fecha ésta ha sido realizada habitualmente por el mismo grupo de investigadores que generaron cada uno de los perfiles. Como ya se ha comentado, actualmente se considera que antes de que un perfil pueda incorporarse a la clínica es necesario que sea validado en diferentes estudios realizados por investigadores independientes, y, a ser posible, con la inclusión de varios miles de enfermas (215,219). Obviamente cuanto menor sea el número de genes del perfil más sencillo y más barato será el análisis, lo que puede suponer un ahorro considerable si la determinación se llega a establecer de manera rutinaria en todas las enfermas con cáncer de mama.

Para intentar dilucidar el potencial papel en la clínica, están en marcha actualmente dos ensayos clínicos. En ambos casos, se trata de demostrar si las pacientes de bajo riesgo pueden evitar la quimioterapia. Uno de ellos, conocido como MINDACT, evalúa el papel del perfil holandés de 70 genes (220). Básicamente, consiste en que se determina el riesgo de recaída de cada caso concreto tanto por factores clínicos como por el perfil. En los casos en que ambos métodos coinciden en la estimación del riesgo, se pauta el

tratamiento oportuno, mientras que en los casos discordantes, se randomiza a las pacientes a recibir tratamiento según el riesgo estimado, bien por el perfil o bien por los factores clínicos. De este modo, se pretende averiguar si la capacidad pronóstica del perfil de 70 genes es superior a la de los factores clínicos combinados que se emplean habitualmente. Incluye pacientes con cáncer de mama estadios I-II operadas, y actualmente se encuentra en fase de reclutamiento de pacientes. Este estudio se está llevando a cabo principalmente en Europa, y está avalado por la European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Para validar los resultados obtenidos por el Índice de recaída (*OncotypeDX*), también se encuentra abierto actualmente el ensayo TAILORx (221). En este estudio, que espera reclutar un total de 10.000 pacientes, se calcula el Índice de recaída; si el riesgo es bajo, no se administra quimioterapia adyuvante, mientras que si el riesgo es alto, sí se administra. En los casos de riesgo intermedio, se randomiza a la paciente a recibir o no quimioterapia adyuvante. En este estudio se considera que, en los casos de bajo y alto riesgo de recaída, el papel del perfil está suficientemente asentado con los datos obtenidos hasta la fecha, y se trata de dilucidar el papel del perfil en el grupo de riesgo intermedio.

Los resultados de estos dos estudios nos ayudarán a conocer con mayor exactitud su aplicabilidad a la práctica clínica habitual. Sin embargo, no podemos afirmar que exista un perfil “ideal”. Por tanto, se deberían llevar a cabo nuevos estudios para tratar de establecer un perfil de consenso que tuviera una gran solidez y una amplia aceptación internacional, con el menor número de genes posible, pero que incluyera genes relacionados tanto con el pronóstico como con la predicción de respuesta o resistencia a fármacos. Sería deseable que este perfil mejorara la capacidad predictiva de recaída de los perfiles existentes, para disminuir en la medida de lo posible el sobretratamiento de

las pacientes. Sin embargo, esto no es previsible que ocurra en un futuro cercano debido a la heterogeneidad y complejidad del cáncer de mama y a las limitaciones que tienen los estudios de múltiples genes en la actualidad. En el momento que los perfiles génicos se consideren válidos para ser utilizados en la clínica, los hospitales deberán dotarse de la tecnología adecuada para la realización de los análisis de expresión génica, y los profesionales sanitarios tendrán que entrenarse en su manejo para obtener los resultados con la mayor fiabilidad y fluidez posible y no demorar la toma de decisiones terapéuticas.

Los resultados del presente estudio indican que se puede simplificar el procedimiento para usar estos perfiles, y abren el camino para su uso a gran escala.

Conclusiones

1. Los tres perfiles génicos mantienen su capacidad pronóstica en una muestra independiente de pacientes, siendo analizados mediante una técnica alternativa (qRT-PCR), y a partir de tejido conservado en parafina.
2. El perfil holandés de 70 genes y el Índice de recaída se confirman como factores pronósticos independientes, con capacidad para predecir la supervivencia libre de metástasis (SLM) en el análisis multivariante.
3. Tanto el perfil holandés de 70 genes como el Índice de recaída presentan una elevada concordancia entre sí a la hora de asignar pacientes a grupos de riesgo de recaída.
4. El empleo de perfiles génicos es superior al empleo de factores clínicos clásicos según Adjuvant!TM a la hora de estimar el pronóstico de las pacientes, y puede evitar el sobretratamiento con quimioterapia de casos con bajo riesgo de recaída.
5. El valor pronóstico del perfil holandés de 70 genes y del Índice de recaída se mantiene en el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar.

Resumen

El cáncer de mama es una entidad con un elevado impacto socio-sanitario, al constituir el tumor más frecuente en las mujeres occidentales y la primera causa de muerte por cáncer en esta población. Actualmente, su diagnóstico es habitualmente realizado en fases precoces de la enfermedad, lo que permite en la mayor parte de los casos un tratamiento con intención curativa. Sin embargo, incluso cuando el diagnóstico se lleva a cabo en fases muy iniciales, existe un porcentaje de pacientes que posteriormente presentará una recaída de la enfermedad, y eventualmente fallecerá a consecuencia de ello. Por lo tanto, desde hace varias décadas se ha estudiado el empleo de tratamientos que disminuyan este riesgo de recaída tras un tratamiento quirúrgico adecuado.

La elección de este tratamiento se basa hoy día en factores clínicos, principalmente la presencia o no de afectación ganglionar y el tamaño tumoral, así como el grado de diferenciación, la edad, la expresión de receptores hormonales y la presencia de Her2-neu. Sin embargo, estos factores no consiguen discriminar adecuadamente qué pacientes van a beneficiarse realmente de estos tratamientos, y es necesario tratar un elevado número de casos para beneficiar sólo a unos pocos. Por ello, es necesario identificar nuevos factores que nos ayuden a individualizar el tratamiento de cada enferma.

En los últimos años, se han desarrollado varios perfiles génicos que pretenden estimar el riesgo de recaída de las pacientes, estableciendo grupos con diferente riesgo. Los más analizados son el perfil holandés de 70 genes, el Índice de recaída (Recurrence Score) y el perfil de 2 genes. Cada uno de estos perfiles logra diferenciar subgrupos de pacientes con diferente riesgo de recaída, con el objetivo de administrar un tratamiento complementario a los casos con un elevado riesgo, mientras que podrían evitarse estos mismos tratamientos en los casos con bajo riesgo. Sin embargo, todos estos perfiles tienen sus limitaciones, y su uso en la práctica diaria no es habitual. Para que alguno de

estos perfiles pueda ser empleado con garantías, deberá ser validado en poblaciones amplias, con tecnologías alternativas y a través de grupos de investigación independientes.

En nuestro estudio hemos conseguido reproducir los resultados de los tres perfiles analizados en una muestra independiente, con una tecnología alternativa (qRT-PCR), a partir de muestras conservadas en parafina y mediante “kits” comerciales. Así mismo, se observa que el rendimiento del perfil holandés de 70 genes y del Índice de recaída es muy similar, mientras que el perfil de 2 genes parece algo inferior, aunque los resultados deben interpretarse con cautela debido al reducido tamaño muestral de nuestro trabajo. El valor pronóstico del perfil holandés y del Índice de recaída se mantiene en el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar, un grupo en el que a día de hoy prácticamente todos los casos reciben un tratamiento quimioterápico complementario que, si se confirman estos resultados, podría evitarse.

A pesar de que nuestro estudio supone una validación en una muestra independiente y con una técnica alternativa de estos perfiles, es preciso esperar a los resultados de los dos grandes estudios prospectivos que se están llevando a cabo (el TAILORx empleando el Índice de recaída, y el MINDACT utilizando el perfil holandés de 70 genes) para poder considerar de forma definitiva su uso en la práctica clínica diaria.

Sin embargo, la investigación en este campo no debe detenerse, puesto que es posible identificar perfiles más precisos, con un menor número de genes, y analizables con técnicas más accesibles, para llegar a ser capaces de individualizar el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

Bibliografía

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics 2006;56(2):106-30.
3. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Hebar V, Suárez B et al. Plan integral del cáncer: situación del cáncer en España. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo; 2003.
4. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342(8):564-71.
5. Johnson-Thompson MC, Guthrie J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer* 2000;88(5 suppl):1224-9.
6. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 1997;75(6):429-39.
7. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* 2003;1(5):362-75.
8. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR et al. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 2001;61(15):5697-702.
9. Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):5974-9.

10. Lerebours F, Lidereau R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44(2):121-41.
11. Polyak K. Gene expression profiling in breast cancer: from molecular portraits to personalized medicine. *Rev Oncol* 2004;6(4):192-202.
12. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9(4):361-77.
13. Abeloff M, Wolff AC, Wood WC, McCormick B, Weber B. Cancer of the breast. In: Abeloff M, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, editors. *Clinical Oncology*. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2004. p. 2369-470.
14. Wood WC, Muss HB, Solin LJ, Olopade OI. Cancer of the breast-2: Malignant tumors of the breast. In: De Vita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practise of Oncology*. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2005. p. 1415-77.
15. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1996;77(1):113-20.
16. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992;20(6):479-89.
17. Toikkanen S, Pylkkanen L, Joensuu H. Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *Br J Cancer* 1997;76(9):1234-40.

18. Mersin H, Yildirim E, Gulben K, Berberoglu U. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma? *Eur J Surg Oncol* 2003;29(4):390-5.
19. Rosen PR, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989;7(3):355-66.
20. Tumores de mama. In: Sobin LH, Wittekind Ch, editors. *TNM: Clasificación de los tumores malignos*. Barcelona: Pulso ediciones; 1999. p. 123-31.
21. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3628-36.
22. Fisher B, Slack NH, Bross ID. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969;24(5):1071-80.
23. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980;45(12):2917-24.
24. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer* 1978;41(3):1170-8.
25. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E, Anderson S, Fisher ER, Wittliff JL et al. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(2):112-20.
26. Espinosa E., Zamora P, Sundlov A. Cáncer de mama: Pronóstico y factores predictivos de respuesta. In: González Barón M, editor. *Factores Pronósticos en Oncología*. Madrid: Interamericana McGraw Hill; 2005. p. 125-38.

27. Engel J, Eckel R, Aydemir U, Aydemir S, Kerr J, Schlesinger-Raab A et al. Determinants and prognoses of locoregional and distant progression in breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(5):1186-95.
28. Vicini FA, Kestin L, Huang R, Martinez A. Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy? *Cancer* 2003;97(4):910-9.
29. Imkampe A, Bendall S, Bates T. The significance of the site of recurrence to subsequent breast cancer survival. *Eur J Surg Oncol* 2006 Oct (Epub ahead of print).
30. Vogel CL, Azevedo S, Hilsenbeck S, East DR, Ayub J. Survival after first recurrence of breast cancer. The Miami experience. *Cancer* 1992;70(1):129-35.
31. Singletary SE, Walsh G, Vauthey JN, Curley S, Sawaya R, Weber KL et al. A role for curative surgery in the treatment of selected patients with metastatic breast cancer. *Oncologist* 2003;8(3):241-51.
32. Pieper DR, Hess KR, Sawaya RE. Role of surgery in the treatment of brain metastases in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1997;4(6):481-90.
33. Harris J.R., Lippman ME, Morrow M, Osborne C.K. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
34. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56(1):67-78.
35. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991;15(4):334-49.

36. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11(11):2090-100.
37. Weiss RB, Woolf SH, Demakos E, Holland JF, Berry DA, Falkson G et al. Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2003;21(9):1825-35.
38. Tabar L, Chen HH, Duffy SW, Yen MF, Chiang CF, Dean PB et al. A novel method for prediction of long-term outcome of women with T1a, T1b, and 10-14 mm invasive breast cancers: a prospective study. *Lancet* 2000;355(9202):429-33.
39. Kuru B, Camlibel M, Ali GM, Alagol H. Prognostic factors affecting survival and disease-free survival in lymph node-negative breast carcinomas. *J Surg Oncol* 2003;83(3):167-72.
40. Leborgne F, Leborgne JH, Ortega B, Doldan R, Zubizarreta E. Breast conservation treatment of early stage breast cancer: patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31(4):765-75.
41. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-7.
42. Newman LA, Kuerer HM, Fornage B, Mirza N, Hunt KK, Ross MI et al. Adverse prognostic significance of infraclavicular lymph nodes detected by ultrasonography in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg* 2001;181(4):313-8.

43. Klauber-DeMore N, Bevilacqua JL, Van Zee KJ, Borgen P, Cody HS, III. Comprehensive review of the management of internal mammary lymph node metastases in breast cancer. *J Am Coll Surg* 2001;193(5):547-55.
44. Olivotto IA, Chua B, Allan SJ, Speers CH, Chia S, Ragaz J. Long-term survival of patients with supraclavicular metastases at diagnosis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(5):851-4.
45. Schnitt SJ. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001(30):22-6.
46. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403-10.
47. Volpi A, Bacci F, Paradiso A, Saragoni L, Scarpi E, Ricci M et al. Prognostic relevance of histological grade and its components in node-negative breast cancer patients. *Mod Pathol* 2004;17(9):1038-44.
48. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Desmedt C. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(4):262-72.
49. Yang Q, Mori I, Sakurai T, Yoshimura G, Suzuma T, Nakamura Y et al. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. *Breast Cancer* 2001;8(2):105-10.
50. Solin LJ, Yeh IT, Kurtz J, Fourquet A, Recht A, Kuske R et al. Ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma) of the breast treated with breast-conserving surgery and definitive irradiation. Correlation of pathologic parameters with outcome of treatment. *Cancer* 1993;71(8):2532-42.

51. Voogd AC, Nielsen M, Peterse JL, Blichert-Toft M, Bartelink H, Overgaard M et al. Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1688-97.
52. Arriagada R, Le MG, Contesso G, Guinebretiere JM, Rochard F, Spielmann M. Predictive factors for local recurrence in 2006 patients with surgically resected small breast cancer. *Ann Oncol* 2002;13(9):1404-13.
53. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(5):888-94.
54. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994(16):35-42.
55. Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(7):550-6.
56. Zamora P, Espinosa E. Cáncer de mama en mujeres ancianas. In: González Barón M, González Montalvo JI, Feliu J, editors. *Cáncer en el anciano*. 1ª ed. Barcelona: Masson; 2001. p. 239-63.
57. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
58. Di Leo A, Cardoso F, Durbecq V, Giuliani R, Mano M, Atalay G et al. Predictive molecular markers in the adjuvant therapy of breast cancer: state of the art in the year 2002. *Int J Clin Oncol* 2002;7(4):245-53.
59. Schmid P, Wischnewsky MB, Sezer O, Bohm R, Possinger K. Prediction of response to hormonal treatment in metastatic breast cancer. *Oncology* 2002;63(4):309-16.

60. Coradini D, Daidone MG, Boracchi P, Biganzoli E, Oriana S, Bresciani G et al. Time-dependent relevance of steroid receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(14):2702-9.
61. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 2003;21(10):1973-9.
62. Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer* 2002;38(10):1329-34.
63. Oved S, Yarden Y. Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature* 2002;416(6877):133-6.
64. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
65. van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988;319(19):1239-45.
66. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3651-64.

67. Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore D, Kasowitz KM, Benz CC et al. Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(18):3230-9.
68. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7(8):1120-8.
69. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10(4):599-605.
70. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75(6):1320-6.
71. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8(4):307-25.
72. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001;19(10):2587-95.
73. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
74. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84.

75. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-72.
76. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;354(20):2103-11.
77. Tanner M, Isola J, Wiklund T et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 2006;24(16):2428-36.
78. Learn PA, Yeh IT, McNutt M et al. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(11):2252-60.
79. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19(18):3808-16.
80. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Harvey HA, Chaudri-Ross HA et al. Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen. *J Clin Oncol* 2003;21(10):1967-72.
81. Love RR, Duc NB, Havighurst TC, Mohsin SK, Zhang Q, DeMets DL et al. Her-2/neu overexpression and response to oophorectomy plus tamoxifen adjuvant therapy in estrogen receptor-positive premenopausal women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(3):453-7.

82. Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(20):3471-9.
83. Knoop AS, Bentzen SM, Nielsen MM, Rasmussen BB, Rose C. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19(14):3376-84.
84. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.
85. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ, Jr., Deshler A et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(13):979-89.
86. Poortmans P. Evidence based radiation oncology: breast cancer. *Radiother Oncol* 2007;84(1):84-101.
87. Kyndi M, Sorensen FB, Knudsen H, Overgaard M, Nielsen HM, Overgaard J. Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2008;26(9):1419-26.
88. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1987;56(4):489-92.

89. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22(3):207-19.
90. D'Eredita' G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer* 2001;37(5):591-6.
91. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007;18(7):1133-44.
92. www.adjuvantonline.com
93. Baum M, Hackshaw A, Houghton J et al. Adjuvant goserelin in pre-menopausal patients with early breast cancer: results from the ZIPP study. *Eur J Cancer* 2006;42(7):895-904.
94. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002;359(9324):2131-9.
95. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349(19):1793-802.
96. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004;350(11):1081-92.

97. Goss PE, Ingle JN, Martino S et al. Efficacy of letrozole extended adjuvant therapy according to estrogen receptor and progesterone receptor status of the primary tumor: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group MA 17. *J Clin Oncol* 2007;25(15):2006-11.
98. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN et al. American society of clinical oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005;23(3):619-29.
99. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;352:930-42.
100. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol* 1990;8(9):1483-96.
101. Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER et al. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol* 2001;19(4):931-42.
102. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, Norris BD, Shepherd LE, Abu-Zahra H et al. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. *National*

- Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2651-8.
103. Hutchins LF, Green SJ, Ravdin PM et al. Randomized, controlled trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil with and without tamoxifen for high-risk, node-negative breast cancer: treatment results of Intergroup Protocol INT-0102. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8313-21.
104. Trudeau ME. Optimizing adjuvant breast cancer chemotherapy: rationale for the MA.21 study. *Oncology (Huntingt)* 2001;15(5 Suppl 7):7-13.
105. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;354(20):2103-11.
106. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(6):976-83.
107. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005;23(16):3686-96.
108. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1431-9.

109. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;352(22):2302-13.
110. Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A, Mastore M, Leutner M, Salvadori B. Cell proliferation in 3,800 node-negative breast cancers: consistency over time of biological and clinical information provided by 3H-thymidine labelling index. *Int J Cancer* 1997;74(1):122-7.
111. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
112. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000;60(3):636-43.
113. Hansen S, Overgaard J, Rose C, Knoop A, Laenkholm AV, Andersen J et al. Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88(1):102-8.
114. Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, Dettmar P, Dutta M, Henrichs C et al. Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(6):1022-8.
115. Malmstrom P, Bendahl PO, Boiesen P, Brunner N, Idvall I, Ferno M. S-phase fraction and urokinase plasminogen activator are better markers for distant recurrences than Nottingham Prognostic Index and histologic grade in a

- prospective study of premenopausal lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(7):2010-9.
116. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(2):116-28.
117. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(20):1566-75.
118. Porter DC, Zhang N, Danes C, McGahren MJ, Harwell RM, Faruki S et al. Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* 2001;21(18):6254-69.
119. Wang L, Shao ZM. Cyclin e expression and prognosis in breast cancer patients: a meta-analysis of published studies. *Cancer Invest.* 2006 Oct;24(6):581-7.
120. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
121. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992;340(8828):1120-4.
122. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1875-87.

123. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, Bak M, Vach W, Rose C. Vascular grading of angiogenesis: prognostic significance in breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82(2):339-47.
124. Heimann R, Ferguson D, Powers C, Recant WM, Weichselbaum RR, Hellman S. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(23):1764-9.
125. Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G, Helmchen B, Bleiweiss IJ, Budman DR et al. Association of angiogenesis and disease outcome in node-positive breast cancer patients treated with adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil: a Cancer and Leukemia Group B correlative science study from protocols 8541/8869. *J Clin Oncol* 2002;20(3):732-42.
126. Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, Bellezza G, De Angelis V, Gori S et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003;81(2):159-68.
127. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16(9):3129-36.
128. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2000;18(7):1423-31.
129. Gasparini G, Toi M, Miceli R, Vermeulen PB, Dittadi R, Biganzoli E et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine

- phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999;5(2):101-11.
130. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1:37-44.:37-44.
131. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253(5015):49-53.
132. Lohmann D, Ruhri C, Schmitt M, Graeff H, Hofler H. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. *Diagn Mol Pathol* 1993;2(1):36-41.
133. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(3):200-6.
134. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(14):1109-14.
135. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwa D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(1):86-96.
136. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000;89(1):51-62.

137. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003;39(4):447-53.
138. Anelli A, Brentani RR, Gadelha AP, Amorim DA, Soares F. Correlation of p53 status with outcome of neoadjuvant chemotherapy using paclitaxel and doxorubicin in stage IIIB breast cancer. *Ann Oncol* 2003;14(3):428-32.
139. Westley BR, May FE. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A(1):15-24.
140. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322(5):297-302.
141. Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1996;105(4):394-402.
142. Ravdin PM, Tandon AK, Allred DC, Clark GM, Fuqua SA, Hilsenbeck SH et al. Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12(3):467-74.
143. Ravdin PM, de Moor CA, Hilsenbeck SG, Samoszuk MK, Vendely PM, Clark GM. Lack of prognostic value of cathepsin D levels for predicting short term outcomes of breast cancer patients. *Cancer Lett* 1997;116(2):177-83.
144. Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti PP, Mancuso S, Messori A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1997;76(5):661-6.

- 145.Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(7):1420-30.
- 146.Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94(1):8-12.
- 147.Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20(16):3404-12.
- 148.Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24(23):3756-62.
- 149.Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating tumor cells in breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20(1):55-60.
- 150.Phillips KA, Andrulis IL, Goodwin PJ. Breast carcinomas arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? *J Clin Oncol* 1999;17(11):3653-63.
- 151.Porter DE, Dixon M, Smyth E, Steel CM. Breast cancer survival in BRCA1 carriers. *Lancet* 1993;341(8838):184-5.
- 152.Robson M. Are BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers different? Prognosis of BRCA1-associated breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(21 Suppl):113S-8S.
- 153.Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free

- survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2003;97(12):2978-87.
- 154.Poremba C, Heine B, Diallo R, Heinecke A, Wai D, Schaefer KL et al. Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol* 2002;198(2):181-9.
- 155.Vizoso F, Plaza E, Vazquez J, Serra C, Lamelas ML, Gonzalez LO et al. Lysozyme expression by breast carcinomas, correlation with clinicopathologic parameters, and prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 2001;8(8):667-74.
- 156.Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88(7):1077-83.
- 157.Bieche I, Girault I, Sabourin JC, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M et al. Prognostic value of maspin mRNA expression in ER alpha-positive postmenopausal breast carcinomas. *Br J Cancer* 2003;88(6):863-70.
- 158.Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Wassmann K. C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5(2):R30-R36.
- 159.Tolgay O, I, Dolled-Filhart M, D'Aquila TG, Camp RL, Rimm DL. Tissue microarray-based studies of patients with lymph node negative breast carcinoma show that met expression is associated with worse outcome but is not correlated with epidermal growth factor family receptors. *Cancer* 2003;97(8):1841-8.
- 160.Bos R, van der GP, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003;97(6):1573-81.

161. Langelotz C, Schmid P, Jakob C, Heider U, Wernecke KD, Possinger K et al. Expression of high-mobility-group-protein HMGI-C mRNA in the peripheral blood is an independent poor prognostic indicator for survival in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88(9):1406-10.
162. Ivanovic V, Todorovic-Rakovic N, Demajo M, Neskovic-Konstantinovic Z, Subota V, Ivanisevic-Milovanovic O et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *Eur J Cancer* 2003;39(4):454-61.
163. Mariadason JM, Augenlicht LH, Arango D. Microarray analysis in the clinical management of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17(2):377-87.
164. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(12):951-60.
165. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996;14(13):1675-80.
166. Guo QM. DNA microarray and cancer. *Curr Opin Oncol* 2003;15(1):36-43.
167. Fresno JA, Cejas P, Domínguez-Cáceres A. Biología molecular aplicada al estudio de los factores pronósticos. In: González Barón M, editor. *Factores Pronósticos en Oncología*. Madrid: Interamericana McGraw-Hill; 2005. p. 17-28.
168. Hampton GM, Frierson HF. Classifying human cancer by analysis of gene expression. *Trends Mol Med* 2003;9(1):5-10.
169. Bair E, Tibshirani R. Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biol* 2004;2(4):E108.

- 170.Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
- 171.Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10(4):413-7.
- 172.Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* 2003;9(5):189-95.
- 173.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
- 174.Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531-7.
- 175.Zhao H, Langerod A, Ji Y, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R et al. Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol Biol Cell* 2004;15(6):2523-36.
- 176.West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(20):11462-7.
- 177.Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(18):10393-8.
- 178.Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.

- 179.Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(19):10869-74.
- 180.Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8418-23.
- 181.Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3(6):537-49.
- 182.Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res* 2000;60(4):1077-83.
- 183.van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.
- 184.van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
- 185.Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteween AT, Pover RC, Bakx N et al. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics* 2006;7:278-87.
- 186.Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM et al. TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic

- signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1183-92.
- 187.Espinosa E, Fresno JA, Redondo A, Sánchez JJ, Hardisson D, Zamora P et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol* 2005;23:7278-85.
- 188.Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365(9460):671-9.
- 189.Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(11):1665-71.
- 190.Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B et al. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3207-14.
- 191.Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-26.
- 192.Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006;8(3):R25.
- 193.Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barnettler A, Fuller A et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607-16.

- 194.Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA et al. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4611-9.
- 195.Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritsier K, Meijer-van Gelder ME, van Staveren IL et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifeno of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol* 2007;25:662-8.
- 196.Jerevall PL, Brommesson S, Strand C, Gruvberger-Saal S, Malmström P, Nordenskjöld B et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer – independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107:225-34.
- 197.Harris EE, Schultz D, Bertsch H, Fox K, Glick J, Solin LJ. Ten-year outcome after combined modality therapy for inflammatory breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(5):1200-8.
- 198.Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, Miller ID, Payne S, Gilbert FJ et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1456-66.
- 199.Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M, Jazaeri AA, Feldman AL, Assersohn L et al. Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002;4(3):R3.
- 200.Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003;362(9381):362-9.

201. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Loriod B et al. Gene Expression Profiling for Molecular Characterization of Inflammatory Breast Cancer and Prediction of Response to Chemotherapy. *Cancer Res* 2004;64(23):8558-65.
202. Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(12):2284-93.
203. Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 2005;23(3):422-31.
204. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23;7265-77.
205. Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, Hilsenbeck SG, Hackett JR, Jeong J et al. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007 Apr 28 [Epub ahead of print].
206. Mina L, Soule SE, Badve S, Baehner FL, Baker J, Cronin M et al. Predicting response to primary chemotherapy: gene expression profiling of paraffin-embedded core biopsy tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:197-208.
207. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee SJ, Baker J et al. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with

- node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. Clin Cancer Res 2005;11(9):3315-9.
- 208.Jansen MP, Foekens JA, van Staveren IL, Dirkzwager-Kiel MM, Ritstier K, Look MP et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. J Clin Oncol 2005;23(4):732-40.
- 209.Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Boss PD, Shu W, Giri DD et al. Genes that mediate breast cancer metastases to the lung. Nature 2005;436(7050):518-24.
- 210.Glinsky GV, Higashiyama T, Glinskii AB. Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival predictor algorithm. Clin Cancer Res 2004;10(7):2272-83.
- 211.Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. Clin Cancer Res 2008;14(9):2601-8.
- 212.Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. Anal Biochem 2002;309(2):293-300.
- 213.Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002;29(1):23-39.
- 214.Lyng MB, Laenkholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. BMC Cancer 2008;8:20-30.
- 215.Ioannidis JP. Microarrays and molecular research: noise discovery? Lancet 2005;365(9458):454-5.

216. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2002;2(5):353-61.
217. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(1):14-8.
218. Ntzani EE, Ioannidis JP. Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcome and correlates: an empirical assessment. *Lancet* 2003;362:1439-44.
219. Liu ET, Karuturi KR. Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med* 2004;350(16):1595-7.
220. Breast International Group. TRANSBIG. MINDACT. www.breastinternationalgroup.org/TRANSBIG/MINDACT. 2007.
221. National Cancer Institute. The TAILORx Breast Cancer Trial. www.cancer.gov/digestpage/TAILORx. 2007.

Claves de las abreviaturas

- AC: esquema de quimioterapia que contiene adriamicina y ciclofosfamida
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
- AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
- ARNc: ácido ribonucleico complementario
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ASCO: *American Society of Clinical Oncology*
- CALGB: *Cancer and Leukemia Group B*
- CMF: esquema de quimioterapia que contiene ciclofosfamida, metotrexate y 5-fluorouracilo
- Ct: *threshold cycle* o ciclo umbral
- EBCTCG: *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*
- EC: esquema de quimioterapia que contiene epirrubicina y ciclofosfamida
- EORTC: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*
- FAC: esquema de quimioterapia que contiene 5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida
- FEC: esquema de quimioterapia que contiene 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida
- FFPE: *formalin-fixed paraffin embedded*
- GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
- HR: *hazard ratio*
- HT: hormonoterapia
- IC: intervalo de confianza
- LHRH: hormona liberadora de hormona luteinizante
- NF: factor de normalización

- NIH: *National Institute of Health*
- NSABP: *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*
- PAAF: punción-aspiración con aguja fina
- PAI-1: inhibidor de la activación del plasminógeno
- qRT-PCR: *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*
- QT: quimioterapia
- RE: receptor de estrógenos
- RH: receptores hormonales
- RP: receptor de progesterona
- RS: *Recurrence Score* (Índice de recaída)
- SAGE: *serial analysis of gene expression*
- SG: supervivencia global
- SLE: supervivencia libre de enfermedad
- SLM: supervivencia libre de metástasis
- SLR: supervivencia libre de recaída
- TAC: esquema de quimioterapia que contiene docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida
- uPA: activador de plasminógeno tipo urokinasa
- VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

